Gaschromatographische Untersuchungen von Fettsäuren verschiedener Bakterienarten

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Hartmut Blaschy

Saarbrücken

1970

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der
Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. W. ZIMMERMANN

GASCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN VON FETTSÄUREN VERSCHIEDENER BAKTERIENARTEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1969

vorgelegt von

HARTMUT BLASCHY
geb. am 20. Juni 1941 in Dresden

Dekan: Prof. Dr. med. G. DHOM
Referent: Prof. Dr. med. Dr. phil. W. ZIMMERMANN

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promotionstermin: 12. Februar 197o

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	3
1.1.	Frühere chemische Lipoidanalysen von Mikroorganismen	3
1.2.	Gaschromatographische Untersuchungen von Bakterienlipiden	7
1.3.	Exogene Ursachen der Veränderung des Lipidgehaltes von Mikroorganismen und chemische Probleme einer Systematik der Bakterien	8
2.	Material und Methodik	13
2.1.	Biologie	13
2.1.1.	Mikroorganismen	13
2.1.2.	Nährmedium	14
2.1.3.	Züchtungsbedingungen	14
2.2.	Gaschromatographie	18
2.2.1.	Prinzip der Gaschromatographie	18
2.2.2.	Technische Daten	22
2.2.3.	Peakidentifizierung	23
2.2.4.	Auswertung der Gaschromatogramme	28
2.3.	Chemie	30
2.3.1.	Chemische Aufarbeitung der Mikroorganismen	30
2.3.2.	Überprüfung der chemischen Methode	34
2.3.2.1.	Vollständigkeit der Extraktion	34
2.3.2.2.	Extraktionstemperatur	35
2.3.2.3.	Vollständigkeit der Veresterung	36

		Seite
3.	Eigene Ergebnisse	40
4.	Diskussion	56
4.1.	Theorien der Fettsäuresynthesen	56
4.2.	Vergleiche der eigenen Ergebnisse mit dem Schrifttum	59
4.3.	Vergleiche der Gaschromatogramme untereinander	71
5.	Zusammenfassung	84
6.	Literaturverzeichnis	85
7.	Danksagung	104
8.	Lebenslauf	105

1. Einleitung

1.1. Frühere chemische Lipoidanalysen von Mikroorganismen

Am Anfang der chemischen Analysen von Lipoiden bei Mikroorganismen standen die Arbeiten über Lipoide der Mykobakterien von R. J. ANDERSON und Mitarbeitern aus dem Jahre 1928. Diese Lipoide wurden nach ihrer Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln (Äther, Chloroform, Alkohol, heißem und kaltem Aceton) unterschieden. Die Untersuchungen wurden in den folgenden Jahren sowohl von ANDERSON (1, 2, 3, 6, 8, 9, 10), als auch von CHARGAFF (11, 12) weitergeführt, die die einzelnen Fraktionen genauer analysierten. 1932 und 1933 begannen CHARGAFF und Mitarbeiter Lipoidanalysen bei Corynebacterium diphtheriae (5, 13). Es standen jedoch bis zum Jahre 1948 die Analysen von Tuberkelbakterien ganz im Vordergrund ((BOISSEVAIN (7), MACHEBOEUF (14, 16), FRANCIOLI (15), ULZER (17), HECHT

(18), ANDERSON (20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 39, 42, 46), SPIELMAN (21), BUTENANT (36), SCHÄFER (38), JACINI (45), HENNEMANN (48)), wobei die verschiedenen Fraktionen der Lipoide genauer untersucht wurden: Phosphatide, Phthionsäure, das "Säurewachs", Leprosin, α - und β-Leprosol, Phthiocerol, freie und gebundene Lipide, acetonunlösliche Lipide, Mykolsäure sowie Lipoidanteile der Antigenstruktur vom Tuberkulin.

Einzelne Untersuchungen befaßten sich auch mit den Lipoiden von Typhus- und Paratyphusbakterien (TSCHERNOCHWOSTOW 41, 43), der Corynebakterien (MACHEBOEUF, 19), Hefen (WEISS, 4), Lipoide von Bacterium tumefaciens (CHARGAFF, 29), und Proteus X_{19} (CINCA, 44).

Im Laufe der fünfziger Jahre erfolgte eine Ausweitung der Lipoiduntersuchungen auf andere Mikroorganismen, z. B. Brucellen ((DUBROWSKAJA, 49, 73), GUBAREW (63, 74), BOLGOWA (84)), Salmonella typhi und paratyphi, über letztere meh-

rere Arbeiten von S. CMELIK (53, 54, 56, 60, 88), Corynebacterium diphtheriae ((GUBAREW (50, 51, 75), KANTSCHUH (55, 66), ALIMOWA (67, 72, 86, 87)), Rhodotorula gracilis (USCHIU, 59), Nocardia (GUINAUD, 83) und E. coli (DAUNDRY, 85). Außerdem wurden die Analysen der Mykobakterien fortgesetzt ((HOFMANN (58), PORTELANCE (62), GASTAMBIDE-ODIER (68), SUZANNE (76), CASON (77, 81), KUBICA (78), SOIMU (79), MORGAN (80)).

Die bis zu diesem Zeitpunkt ausgeführten Analysenmethoden unterschieden die Lipoide im wesentlichen nach ihrer Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, nach dem Schmelzpunkt und der Jodzahl. 1952 erfolgte die Einführung der Gaschromatographie von JAMES und MARTIN (89) und von den gleichen Autoren die Analyse von Lipoiden im Kulturmedium von Ps. aeruginosa (114). Seit der Mitte der fünfziger Jahre erweiterten sich die analytischen Methoden durch die Anwendung der Infrarotspektrometrie ((FREEMAN (69),

KUBICA (78)), von chromatographischen Methoden ((GUBAREW (74), SAITO (82)) und durch die Gaschromatographie, obwohl die hergebrachte Methodik bei weitem die häufigste war. Mit letzterer wurden die Lipoidanalysen erneut auf Hefen (HURST, 52), Corynebakterien (CMELIK, 61), und zwar in verschiedenen Nährlösungen, Streptokokken (HOFMANN, 64) ausgedehnt. Während in den früheren Untersuchungen die Bestandteile der Lipoide an sich im Vordergrund standen, kamen in den fünfziger Jahren als neue Gesichtspunkte der Untersuchungen die Lipoidveränderungen unter Antibiotikaeinfluß ((HOFMANN, 58), USCHIU (59)), die die Lipoidveränderungen im Zusammenhang mit der Virulenz (CMELIK, 56), die chemischen Veränderungen unter Phageneinfluß (DUBROWSKAJA, 73) und die antigenen Eigenschaften der Lipoide (KWAPINSKI, 70) hinzu.

1.2. Gaschromatographische Untersuchungen von Bakterienlipoiden

Die Arbeiten der Jahre 1960 bis 1968 umfassen zahlreiche Untersuchungen der Fettsäurezusammensetzung verschiedener Mikroorganismen und Pilze. Zu den untersuchten Mikroorganismen gehören E. coli ((ABEL (93), VACZI (95), CHO (106), KANESHIRO (107, 110), ASSELINEAU (108), O´LEARY (109), DAUNDRY (111)), Sarcinaarten ((AKASHI (116), ALBRO (129), TORNABENE (130, 133)), Bacillus subtilis ((KANEDA (115), AKASHI (116)), Azotobacter agilis (KANESHIRO, 107), Agrobacterium tumefaciens (KANESHIRO, 107), Laktobazillen ((THORNE (112), MACFARLANE (117)), Staphylococcus aureus ((ISHIZUKA (96), MACFARLANE (117)), Salmonella typhimurium (MACFARLANE, 117), Pithomyces chartarum und verwandte Pilze (HARTMANN, 120), verschiedene Nocardien (BORDET, 119), Neisserien (YAMAKAWA, 92), Corynebacterium diphtheriae ((KATES, (98), ASSELINEAU (102), MOSS (132)), Enterobakterien

(VACZI, 95), einzelne Vertreter der Familie der Lactobacteriaceae (O'LEARY, 121), Arthrobacter globiformis (WALKER, 122), Debaromyces hansenii (MERDINGER, 126), einige Streptomycesarten (BALLIO, 128), vergleichende Untersuchungen von grampositiven und gramnegativen Keimen (MASTROENI, 94), über die Familie der Micrococcaceae (ISHIZUKA, 96), Pseudomonas aeruginosa ((ROMERO (113), JAMES (114), CHO (106), VACZI (95)), Streptomyces pyogenes ((CHO (106), PANOS (118)), Unterscheidung von E. coli und Aerobacter globiformis (BAWDON, 125) und Pullularia pullulans (MERDINGER, 127). Auf Einzelheiten wird im Zusammenhang mit den vorliegenden Ergebnissen eingegangen werden.

1.3. Exogene Ursachen der Veränderungen im Lipoidgehalt von Mikroorganismen

Wie O'LEARY (134) anhand zahlreicher Literaturhinweise darlegt, ist der Lipoidgehalt einer Bakterienart von zahlreichen äußeren Faktoren abhängig.

Die Hauptrolle spielt die Zusammensetzung der Kulturmedien. Große Kohlehydratmengen und eine begrenzte Stickstoffquelle erhöhen den Gesamtfettgehalt und den Anteil der gesättigten Fettsäuren, ein hoher Stickstoffgehalt oder der Ersatz der Glukose durch Glycerin vermindert den Gesamtfettgehalt und erhöht den Anteil der ungesättigten Fettsäuren. Generell läßt sich sagen, daß Bakterien die Aufnahme der im Medium vorhandenen Vorstufen der Lipoide oder diese selbst bevorzugen, so daß, wie HOFMANN und Mitarbeiter ((zitiert nach O´LEARY (134)) zeigen konnten, der Fettgehalt der Bakterien durch einfache Variation der Fettsäuren im Nährmedium geradezu reguliert werden konnte.

Neben der Zusammensetzung des Nährmediums spielen auch physikalische Faktoren bei der Fettsäurezusammensetzung eine Rolle. So erfolgt bei niedriger Temperatur eine vermehrte Bildung ungesättigter Fettsäuren, bei höherer Temperatur jedoch eine Verringerung. Auch die osmotischen Verhält-

nisse und der pH können zu erheblichen Schwankungen führen. Über den Mechanismus der Veränderungen ist wenig bekannt.

Schließlich wird noch die Variation der Fettsäurezusammensetzung in Abhängigkeit vom Kulturalter erwähnt. Bei E. coli, Lactobacillus arabinosus und Serratia marcescens vermindern sich die ungesättigten Fettsäuren mit zunehmendem Alter der Kultur, während die cyclopropanhaltigen Fettsäuren zunehmen. Generell wurde bei längerem Wachstum eine Verminderung der ungesättigten und eine Vermehrung der gesättigten Fettsäuren gefunden.

Aus diesen Tatsachen ergibt sich einerseits die Notwendigkeit, alle Mikroorganismen, deren Fettsäurezusammensetzung verglichen werden soll, auf einem Nährmedium unter gleichen Bedingungen zu züchten und in der gleichen Wachstumsphase zu ernten. Andererseits ist der Vergleich der so erhaltenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren, die nicht mit genau gleicher Methodik erhalten wurden, nur unter Vorbehalt möglich.

Probleme einer Systematik der Bakterien

Eine systematische Einteilung der Mikroorganismen kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen, z. B. nach der Morphologie, nach biochemischen Leistungen, nach dem Aufbau der Zellwände, nach serologischen Reaktionen oder nach dem Guanosin-Cytosin-Verhältnis (DE LEY, 135). Eine Einordnung der Mikroorganismen nach diesen Gesichtspunkten führte bislang zu teilweise nicht übereinstimmenden Systematiken; erschwerend kommt noch hinzu, daß eine verschiedene Bewertung der Einordnungskriterien die Möglichkeit einer allgemein gültigen Systematik einschränkt (SEELIGER, 136). Aus diesem Grund wird auch im Vorwort zur 7. Auflage von "BERGEY's Manual" ausgeführt: "Wir hoffen, daß dieses Handbuch dazu dienen wird, weitere Anstrengungen zu machen, die die Klassifizierung der Bakterien vervollständigen können".

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit soll die Frage beantwortet werden, wieweit sich Bak-

terienarten verschiedener Familien in der gaschromatographisch ermittelten Fettsäurezusammensetzung unter einheitlichen Kulturbedingungen unterscheiden und wieweit sich diese Methode zu einer Klassifizierung eignen könnte.

2. Material und Methodik

2.1. Biologie

2.1.1. Mikroorganismen

Folgende Mikroorganismen wurden untersucht: Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145 (Ps. aer.), Escherichia coli ATCC 11105 (E. coli), Staphylococcus aureus (St. aureus), Streptococcus uberis (zur Verfügung gestellt von der Tierärztlichen Hochschule Hannover) (Str. uberis), Lactobacillus acidophilus ATCC 4963 (L. acidophilus), Corynebacterium diphtheriae (C. diphth.) Stamm "Trier", Bacillus subtilis ATCC 6051 (B. subtilis), Nocardia rubra (N. rubra), (Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen) und Rhodotorula mucilaginosa (R. mucilaginosa). Soweit die Herkunft nicht näher bezeichnet ist, stammen die Reinkulturen aus der Sammlung des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie in Homburg/Saar.

2.1.2. Nährmedium

Alle Organismen wuchsen auf dem Nährboden nach MARSHALL u. a. (103):

Casein Digest (Oxoid Tryptone Code Nr. L 41)	10 g
Hefeautolysat (Oxoid Code Nr. L 21)	5 g
Na-Glycerophosphat (Merck Nr. 4164)	10 g
Kaliumlaktat (50 % w/w)	10 ml
Glukose (p. a.)	2 g
anorganische Salzlösung	5 ml

A. dest. auf 1000 ml auffüllen

Anorganische Salzlösung:

4,0 g $MgSO_4 . 7\ H_2O$, 0,4 g $MnSO_4 . 4\ H_2O$, 0,4 g $FeSO_4 . 7\ H_2O$, dazu 100 ml A. dest., mit 2 Tropfen 10 n H_2SO_4 angesäuert.

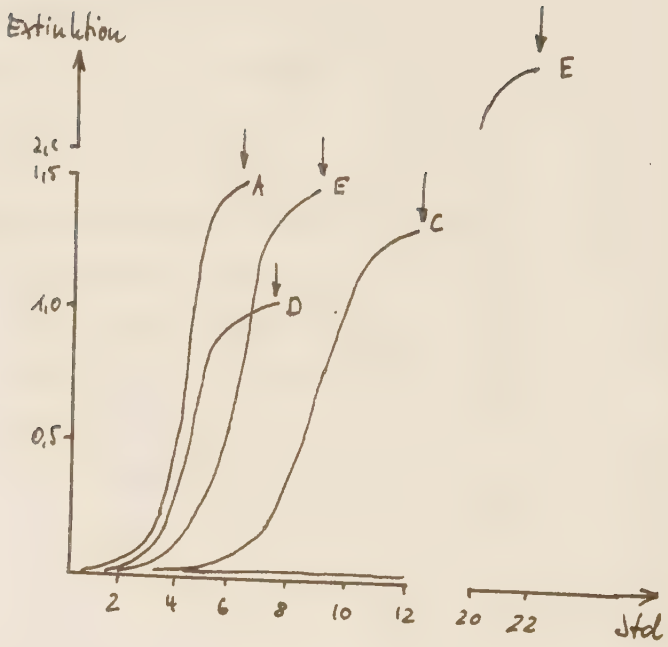
Nährlösungs-pH: 7,0-7,2, bei L. acidophilus 6,0-6,5, R. mucilaginosa 5,5-6,0.

2.1.3. Züchtungsbedingungen

Zur Vorkultur der Mikroorganismen wurde das Nährmedium nach MARSHALL (103) nach Zusatz von 1 % Agar in Petrischalen gegossen, für die Züchtung von Laktobazillen in Röhrchen. Nach der Beimpfung der Nährböden mit den zu unter-

suchenden Keimen folgte die Vorbebrütung 24 Stunden bei 37°C. Ausnahmen bildeten R. mucilaginosa und N. rubra, die 48 Stunden bei 27°C bebrütet wurden. Die Reinheitskontrolle erfolgte durch die Untersuchung eines Grampräparates auf Homogenität. Nach der Vorbebrütung wurde der Bakterienrasen abgeschwemmt und mit der Suspension anschließend 6 Liter Nährlösung beimpft, die auf 15 Kolben verteilt war. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C im Schüttelapparat, mit Ausnahme der mikroaerophilen Laktobazillen, die in Kolben im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden und R. mucilaginosa und N. rubra, die zum Wachstum im Schüttelapparat 27°C benötigten.

Abbildung 1



Zunahme der Trübung in flüssigen Kulturen von A: E. coli, B: St. aureus, C: L. acidophilus, D: B. subtilis, E: N. rubra, als Beispiel für den Wachstumsverlauf. Der Pfeil bezeichnet den Erntezeitpunkt.

Zur Kontrolle des Wachstums entnahmen wir stündlich 3 ml Nährmedium aus einem Kolben zur nephelometrischen Messung (Photometer Eppendorf) bei 578 nm in 5 ml Küvetten, gegen den unbeimpften Nährboden als Leerwert. Bei der Wellenlänge von 578 nm fand sich die geringste Extinktion des unbeimpften Nährmediums. Bei Auftragen der Extinktionswerte gegen die Zeit ergab sich der Wachstumsverlauf während der Bebrütung (vergl. Abb. 1, S. 16). Am Ende der Phase des logarithmischen Wachstums (Pfeil in der Abb. 1) erfolgte eine Reinheitskontrolle mittels eines Grampräparates und die Trennung der Bakterien vom Medium durch Zentrifugieren bei 6000 Umdr./min für 15 Minuten. Darauf wurde die Bakterienfeuchtsubstanz auf vier Zentrifugenkolben mit Schliff NS 14,5 verteilt, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und 12 Stunden im Vacuum gefriergetrocknet. In jedem Kolben befanden sich 300 - 500 mg Bakterientrockensubstanz. Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit des Analysenganges wurden diese Kolben getrennt aufgearbeitet, wobei sich identische Er-

gebnisse zeigten. Auch nach wiederholter Züchtung eines Bakterienstammes unter denselben Bedingungen waren die Ergebnisse wiederum gleich.

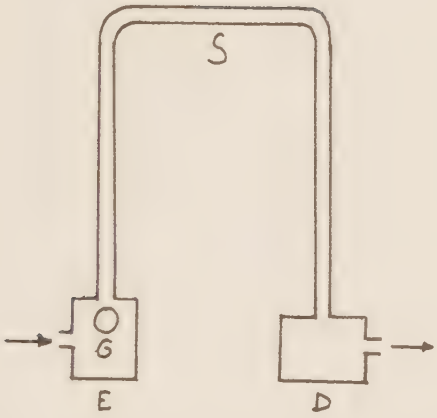
2.2. Gaschromatographie

2.2.1. Prinzip der Gaschromatographie

Hier soll nur soweit auf das Prinzip des Analysenvorganges eingegangen werden, wie es für das Verständnis der Gaschromatogramme notwendig ist.

Der Gaschromatograph besteht aus drei funktionellen Teilen, die miteinander gasdicht verbunden sind und nacheinander vom Trägergas durchströmt werden: 1. Einspritzblock, 2. Säule, 3. Detektor (s. Abb. 2).

Abbildung 2



Funktionelle Teile eines Gaschromatographen.

E: Einspritzblock,

S: Säule,

D: Detektor,

G: Gummimembran.

Pfeil: Eintrittsort und -richtung des Trägergases.

Der Einspritzblock ist ein hohler Metallwürfel, dessen Innenraum durch eine Gummimembran von außen zugänglich ist und in den das Trägergas einströmt. Er hat eine hohe Temperatur, um die eingespritzten Substanzen zu verdampfen. Die Säule ist U-förmig oder spiralig gebogen und mit einem feinkörnigen, porösen Material, dem Trägermaterial, gefüllt, das mit einem dünnen Film, der stationären Phase, überzogen ist. Als Detektor wurde ein Hitzdrahtdetektor verwendet. Er besteht aus einem von Trägergas durchströmten Metallzylinder, in dessen Längsachsenverlauf sich ein glühender Draht befindet. Infolge des Temperaturunterschiedes von Draht und Zylinderwand entsteht ein Wärmestrom, der durch die vom Trägergas mitgeführte Analysensubstanz verändert wird.

Funktion der Anordnung: Mittels einer Spritze werden durch die Gummimembran 1-10 µl einer Lösung der zu analysierenden Substanzen in den Einspritzblock gebracht, wo sie verdampfen. Die

verdampfte Probe wird von dem Trägergas durch die Säule getragen.

In der Säule verteilen sich die Verbindungen zwischen der flüssigen Phase und dem Trägergas. Es kommt dadurch zu Unterschieden in der Wandergeschwindigkeit der einzelnen, zu trennenden Komponenten entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften (z. B. Kettenlänge, Doppelbindungen, Verzweigungen). Die Zeit, die eine Substanz zum Durchlaufen der Säule benötigt, die Retentionszeit, ist infolge der Verteilung zwischen Trägergas und flüssiger Phase abhängig von ihren chemischen Eigenschaften. Dadurch treten die chemisch verschiedenen Substanzen, die zusammen in gelöster Form injiziert wurden, hintereinander aus der Säule und gelangen mit dem strömenden Trägergas in den Detektor.

Die dort verursachte Änderung des Wärmestroms zwischen Draht und Zylinderwand führt zu einer Temperaturänderung und damit zu einer Widerstandsänderung des Hitzdrahtes, welche nach Ver-

stärkung einen Schreibhebel zum Ausschlag bringt. Größe und Dauer des Ausschlages sind der durchlaufenden Substanzmenge proportional. Der Schreiberausschlag wird auf einem fortlaufenden Papier aufgezeichnet und zeigt dadurch ein dreieckähnliches Bild, das als "Peak" bezeichnet wird. Die Fläche dieser Peaks ist der Substanzmenge proportional, der Zeitpunkt des Auftretens gibt Aufschluß über chemische Eigenschaften der Substanz.

2.2.2. Technische Daten

Die Gaschromatogramme wurden aufgenommen mit einem Perkin-Elmer Fraktometer 116 E, das mit einem Hitzdrahtdetektor ausgestattet war. An das Gerät wurde ein Schreiber (Beckmann, 1-100 mV) angeschlossen. Daten der gaschromatographischen Säule: Länge 2 m, Innendurchmesser: 4,65 mm rostfreier Stahl. Trägermaterial: Celite 545, mesh 60...100, stationäre Phase: Äthylenglykolsuccinat 15 %, Trägergas: Helium, Durchflußrate: 76 ml/min, Säulentemperatur: 190°C isotherm.

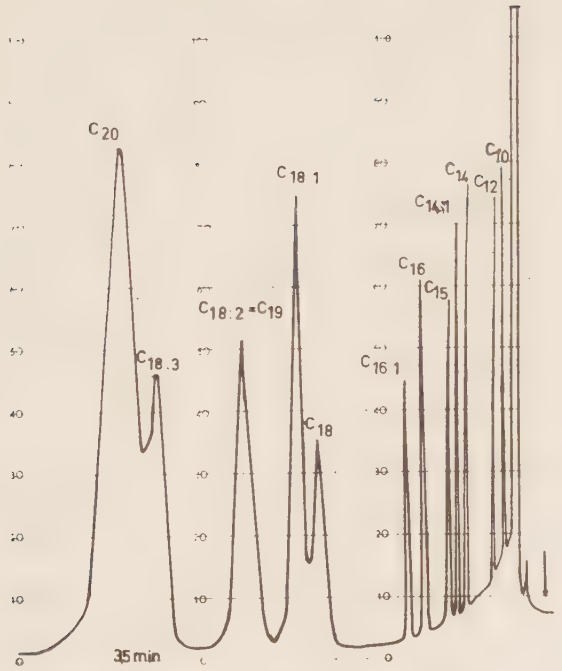
Die Einspritzblocktemperatur wurde auf 330°C gestellt, um die injizierten Fettsäuremethylester rasch und vollständig zu verdampfen. Da sich die Säulentemperatur im Laufe eines Chromatogramms nicht änderte, zeigten die kurzkettigen Fettsäuremethylester sehr kurze Retentionszeiten und sehr schmale, hohe Peaks, während die langkettigen Fettsäuremethylester lange Retentionszeiten mit breiten, flachen Peaks ergaben. Die eingespritzten Probenmengen schwankten zwischen 2 und 10 µl, je nach Konzentration der Probenlösung. Die Empfindlichkeit des Detektors lag zwischen 1 und 8.

2.2.3. Peakidentifizierung

Zur Identifizierung der Peaks wurden bekannte Methylester (Applied Science Laboratories, Inc., State College, Pa.) folgender Fettsäuren benutzt: Caprinsäure $CH_3(CH_2)_8COOH$ (weiter mit C_{10}) bezeichnet), Laurinsäure $CH_3(CH_2)_{10}COOH$ (C_{12}), Myristinsäure $CH_3(CH_2)_{12}COOH$ (C_{14}), Myristoleinsäure $CH_3(CH_2)_3$-CH=CH-$(CH_2)_7COOH$

($C_{14:1}$), Pentadecanoinsäure $CH_3(CH_2)_{13}COOH$ (C_{15}), Palmitinsäure $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ (C_{16}), Palmitoleinsäure $CH_3(CH_2)_5$ CH=CH $(CH_2)_7$ COOH ($C_{16:1}$), Stearinsäure $CH_3(CH_2)_{16}COOH$ (C_{18}), Oleinsäure $CH_3(CH_2)_7$ CH=CH $(CH_2)_7$ COOH ($_{18:1}$), Linolsäure $CH_3(CH_2)_4$ CH=CH-CH_2-CH=CH $(CH_2)_7COOH$ ($C_{18:2}$), Linolensäure CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-$(CH_2)_7COOH$ ($C_{18:3}$), Nonadecanoinsäure CH_3 $(CH_2)_{17}COOH$ (C_{19}), Arachidonsäure CH_3 $(CH_2)_{18}COOH$ (C_{20}). Im folgenden Text werden die Fettsäuren nur noch mit der Anzahl ihrer C-Atome und ggf. mit der Anzahl ihrer Doppelbindungen entsprechend den o. a. Abkürzungen bezeichnet. Die Abbildung 3 zeigt ein Testchromatogramm der angeführten Fettsäuren. Die technischen Daten waren wie folgt: Säulentemperatur 196°C, Einspritzblocktemperatur 330°C. Trägergasdurchflußrate 78 ml/min, Probenmenge 8 µl, Empfindlichkeit 4 x, Papiervorschub 0,2 inch/min. (Abbildung 3)

Abbildung 3



Testchromatogramm der angeführten Fettsäuremethylester. Peakbenennungen entsprechen den Abkürzungen im Text S. 23/24. Der senkrechte Pfeil am rechten Bildrand bezeichnet den Beginn, die Minutenangabe die Dauer des Chromatogramms.

Um die Verhältnisse des Testchromatogramms auf die Chromatogramme der Bakterien zu übertragen, wurden als erstes die Retentionszeiten der einzelnen Peaks des Testchromatogramms durch Messen der Strecke vom Beginn des Chromatogramms (Pfeilspitze) bis zur Peakspitze bestimmt. Als zweites wurden die Verhältnisse der Retentionszeiten nacheinanderfolgender Peaks durch Division errechnet. Diese Quotienten sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Mit ihrer Hilfe konnte man die unbekannten Peaks eines Bakterienchromatogramms, soweit sie den Methylestern des Testchromatogramms entsprachen, bestimmen, wenn die Retentionszeit eines einzigen Peaks in diesem bekannt war, was durch Injektion eines einzelnen, bekannten Methylesters nach dem Chromatogramm einer Bakterienprobe geschah. Bei getrennter Injektion von $C_{18:2}$ und C_{19} ergaben sich gleiche Retentionszeiten. (Tabelle 1)

Tabelle 1

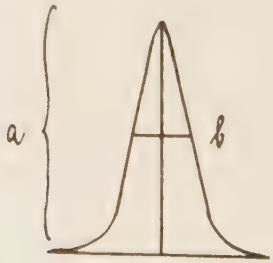
$C_{10}:C_{12}$	= 1,95	$C_{16}:C_{18}$	= 1,95
$C_{12}:C_{14}$	= 1,97	$C_{18}:C_{18:1}$	= 1,18
$C_{14}:C_{14:1}$	= 1,15	$C_{18}:C_{18:2}$	= 1,39
$C_{14}:C_{15}$	= 1,38	$C_{18}:C_{18:3}$	= 1,80
$C_{15}:C_{16}$	= 1,40	$C_{18}:C_{20}$	= 1,93
$C_{16}:C_{16:1}$	= 1,13		

Verhältnisse der Retentionszeiten aufeinanderfolgender Peaks im Testchromatogramm (s. Abb. 3)

2.2.4. Auswertung der Gaschromatogramme

Aus den Gaschromatogrammen wurden die prozentualen Anteile der einzelnen Peakflächen an der Gesamtfläche aller Peaks eines Chromatogramms errechnet. Da die Peakfläche einer Substanz ihrer Menge proportional war, erhielt man durch ihre Berechnung die prozentualen Anteile der einzelnen Fettsäuren eines Bakterienchromatogramms. Dazu wurden die Peakflächen ermittelt durch Multiplikation der Peakhöhe mit der sog. Halbwertsbreite, der Peakbreite in halber Höhe . (Vergl. Abb. 4).

Abbildung 4



Berechnung der Peakfläche durch Multiplikation der Peakhöhe a mit der Halbwertsbreite b.

Die Summe aller Peakflächen eines Chromatogramms wurde mit 100 % gleichgesetzt und die Anteile der einzelnen Peaks ermittelt. So ergab sich bei jedem Chromatogramm die Verteilung der Fettsäuren nach Art und prozentualem Anteil.

Von jeder Bakterienart wurden mindestens fünf Chromatogramme angefertigt und deren prozentuale Verteilung der Fettsäuren arithmetisch gemittelt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen prozentualen Anteilen derselben Peaks derselben Bakterienart lagen bei $\pm$ 2 %. Die Summe der wieder addierten Prozentzahlen der einzelnen Peaks ergab durchschnittlich 99,5 %. Peakflächen, die mit weniger als 1 % an der Gesamtfläche beteiligt waren, wurden als "Spur" bezeichnet.

2.3. Chemie

2.3.1. Chemische Aufarbeitung der Mikroorganismen

Die chemische Methode bestand aus zwei Teilen:

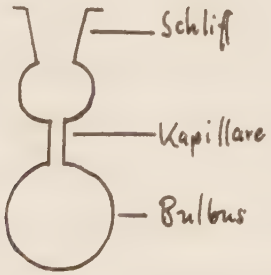
1) Extraktion der Bakterienmasse

2) Veresterung der Fettsäuren.

Zwecks Extraktion wurden zu der Bakterienmasse eines Zentrifugenkolbens, 300-500 mg Trokkensubstanz, 20 ml eines Extraktionsgemisches aus Chloroform-Dichlormethan 1:1 (v/v) (Fa. Merck, p. a.) hinzugefügt, der Kolben an einen Kühler angeschlossen und für 20 Minuten in ein kochendes Wasserbad gebracht. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 ml Wasser, kräftiges Schütteln und Zentrifugieren bei 6000 r. p. m. für 10 Minuten. Dadurch trennte sich das Gemisch in eine die Bakterienmasse enthaltende wässrige Schicht und in die klare, darunterliegende Lösungsmittelschicht. Diese wurde mittels einer Kolbenspritze abgesaugt, durch ein Papierfilter mit geglühtem Aluminiumoxyd zur Wasserentfernung in einen 50 ml-Rundkolben mit Schliff

überführt und in einem Rotationsverdampfer eingedampft. Der Extrakt wurde mit 3 ml Extraktionsgemisch aufgenommen, in ein Kölbchen nach ENDRES (104) (s. Abb. 5) überführt und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer eingedampft.

Abbildung 5



Kölbchen zur Veresterung von Fettsäuren nach ENDRES (104). Erklärung siehe Text.

Zur Veresterung der Fettsäuren wurde ein Kölbchen nach ENDRES (104) als Gefäß verwendet. Es bestand aus einem Bulbus von 10 ml Volumen, auf den eine Glaskapillare (Länge 15 mm,

Innendurchmesser 3 mm) aufgesetzt war. Nach oben war die Kapillare mit einem Schliff (NS 14,5) zum Anschluß an Kühler oder Rotationsverdampfer verbunden. In diesem Kölbchen wurden die Glyceride verseift und die Fettsäuren nach der Methode von METCALFE u. a. (105) in ihre Methylester überführt. Alle Zugaben und Entnahmen mußten durch die Kapillare mit einer Spritze geschehen.

Nach der Überführung des Extraktes in das Kölbchen und Eindampfen im Rotationsverdampfer (s. o.) wurde zu dem Rückstand 1 ml einer 0,5 n - methanolischen, wasserfreien KOH-Lösung gegeben und am Rückfluß im Wasserbad für 5 Minuten gekocht; danach erfolgte die Zugabe von 2 ml einer 14 % (w/w), methanolischen, wasserfreien Bortrifluoridlösung und Kochen am Rückfluß für 3 Minuten zur Veresterung der Fettsäuren. Die Unterbrechung der Reaktion geschah durch Zugabe von 2 ml gesättigter Kochsalzlösung und 1 ml Hexan (Merck, p. a.). Durch anschließendes

Zentrifugieren bei 6000 Umdr/min für 10 Minuten stiegen die Methylester wegen ihres geringeren spezifischen Gewichts aus der Kochsalzlösung an deren Oberfläche und lösten sich in dem darüber befindlichen Hexan. In dem Kölbchen lagen nach dem Zentrifugieren also zwei Schichten vor: eine untere Kochsalzlösungsschicht und eine obere Hexanschicht, in der sich die gelösten Methylester befanden. Zur Entfernung der Hexanschicht wurde soviel Kochsalzlösung hinzugefügt, daß sich die Trennungslinie beider Schichten in der Mitte der Kapillare des Kölbchens befand. Die quantitative Entfernung der Hexanschicht mittels einer 100 µl Hamilton-Spritze war einfach. In einem Rotationsverdampfer wurde zwecks Konzentrierung das Hexan auf 20-50 µl eingedampft, wodurch die Probe fertig war zur Injektion.

2.3.2. Überprüfung der chemischen Methode

2.3.2.1. Vollständigkeit der Extraktion

Die Bakterienmasse wurde wie oben angegeben mit 20 ml Extraktionsmittel 20 Minuten am Rückfluß im kochenden Wasserbad extrahiert. Darauf erfolgte eine erneute Extraktion derselben Bakterienmasse am Rückfluß im kochenden Wasserbad für 3 Stunden. Diese Zeit wurde deshalb gewählt, weil im Schrifttum die verbreitetste Extraktionsmethode im Kochen der Biomasse am Rückfluß mit einem Chloroform-Methanolgemisch während 3 Stunden besteht. Nach 3 Stunden wurde das Lösungsmittel in einen vorher gewogenen Rundkolben überführt und im Rotationsverdampfer eingedampft. Bei der anschließenden Gewichtsbestimmung entstand keine Differenz zu dem leeren Kolben. Hiermit konnte angenommen werden, daß keine der mit diesem Lösungsmittel extrahierbaren Lipoide in der Biomasse zurückgeblieben waren.

2.3.2.2. Untersuchung der Extraktionstemperatur

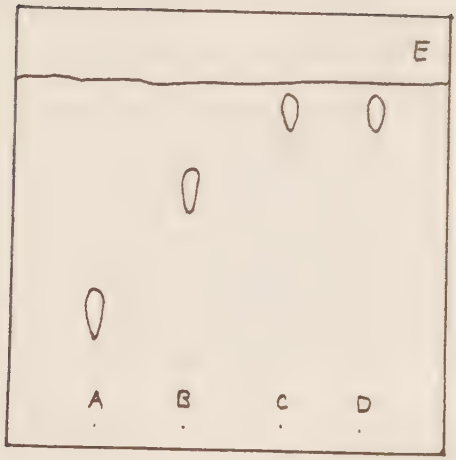
300 mg Bakterientrockensubstanz wurden in zwei etwa gleiche Teile geteilt. Die eine Hälfte wurde in der beschriebenen Weise verarbeitet und in den Gaschromatographen injiziert. Die zweite Hälfte wurde mit 25 ml Extraktionsmittel vermengt und dreimal 24 Stunden unter öfterem Umschütteln in mit Schliffstopfen verschlossenen Kolben bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wurde die Lösungsmittelschicht abgehoben, wie üblich verarbeitet und gaschromatographiert. Beim Vergleich des Gaschromatogramms des 10-Minuten-Extraktes mit dem des 3-Tage-Extraktes zeigten sich keine Unterschiede. Hiermit wurde angenommen, daß eine heiße Extraktion für 20 Minuten im Vergleich zu einer kalten Extraktion über 3 Tage zu keiner Veränderung der Fettsäuren selbst oder ihrer Zusammensetzung führte.

2.3.2.3. Vollständigkeit der Veresterung

Zur Klärung der Frage, ob Fettsäuren und Triglyceride durch die angewendete Methode quantitativ verestert wurden, wurde ein Gemisch aus je 2 mg der Fettsäuren von C_{10} bis C_{20} und 2 mg des Triglycerids der Palmitinsäure hergestellt.

Nach Verseifung und Veresterung in oben beschriebener Weise wurde die Hälfte des Methylestergemisches gaschromatographiert, die zweite Hälfte auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Hierfür fanden Glasplatten 20 cm x 20 cm Anwendung. Sie wurden mit Kieselgel G (Merck) und 2 % Borsäure in einer Dicke von 250 µ beschichtet. Das Fließmittel bestand aus 85 % Hexan mit 15 % Äther. Als Indikator wurden 0,03 % wässrige Uraninlösung und UV-Licht verwendet. Zusammen mit dem Methylestergemisch aus der Bakterienmasse wurden am Unterrand der Dünnschichtplatte Palmitinsäure, deren Triglycerid und deren Methylester getrennt aufgetragen. (Vergl. Abb. 6).

Abbildung 6



Dünnschichtchromatogramm verschiedener Substanzklassen (A: Fettsäure, B: Triglycerid, C: Methylester) im Vergleich mit einer aus Fettsäure und Triglycerid gewonnenen Methylesterlösung D, die mit der beschriebenen Technik hergestellt wurde. E: Fließmittelfront.

Die Entwicklung dauerte 20 Minuten, wobei die Fließmittelfront 18 cm stieg. Nach Trocknen der Platte und Besprühen mit Uraninlösung zeigten sich im UV-Licht verschieden lange Laufstrecken der einzelnen Substanzklassen, wobei die Methylester am weitesten und die Fettsäuren am wenigsten wanderten (s. Abb. 6). Der nach der Veresterung im ENDRES-Kölbchen befindliche Rückstand wurde mit Chloroform aufgenommen und wieder dünnschichtchromatographiert. Hierbei zeigten sich noch Flecke, die den Fettsäuren und dem Triglycerid entsprachen.

Im Gaschromatogramm der Probe D in Abb. 6 wurde die prozentuale Verteilung der einzelnen Methylester ermittelt. Der Vergleich dieser prozentualen Verteilung mit derjenigen im Ausgangsgemisch der Fettsäuren und des Triglycerids zeigte Übereinstimmung.

Diese Untersuchung zeigte:

1) daß nur Methylester in den Gaschromatographen injiziert wurden,

2) daß der Veresterungsvorgang nicht quantitativ war und

3) daß die Veresterung nicht selektiv für bestimmte Fettsäuren erfolgte.

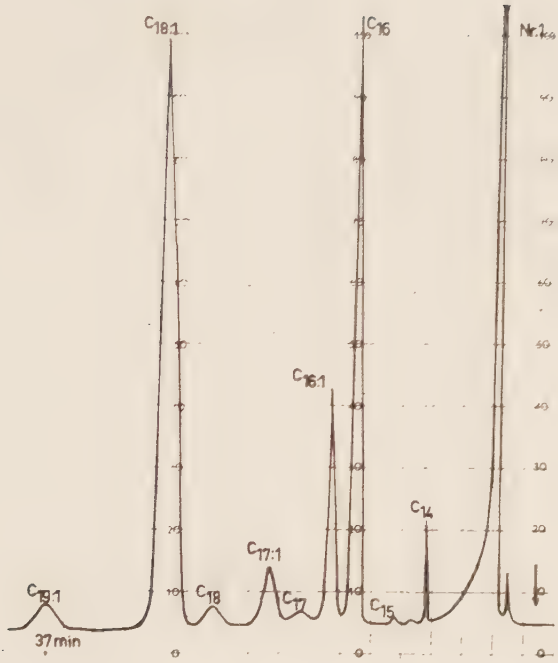
3. Eigene Ergebnisse

Im folgenden Text sollen nur die Hauptbestandteile der Fettsäuren der untersuchten Bakterien angeführt werden. Eine vollständige Zusammenfassung findet sich in Tabelle 2. In den folgenden Abbildungen entsprechen die Peakbenennungen den Abkürzungen der Fettsäuren auf Seite 23/24, die Zeitangabe unter dem letzten Peak bezeichnet die Dauer des Chromatogramms.

Pseudomonas aeruginosa:

Der größte Bestandteil ist C_{16}, dann folgen in absteigender Menge $C_{18:1}$ und $C_{16:1}$.
(Abbildung 7)

Abbildung 7



Gaschromatogramm von Pseudomonas aeruginosa

Säulentemperatur: 187°C

Durchflußrate: 86 ml/min

Probenmenge: 6 µl

Empfindlichkeit: 2 x

Papiervorschub: 0,2 inch/min

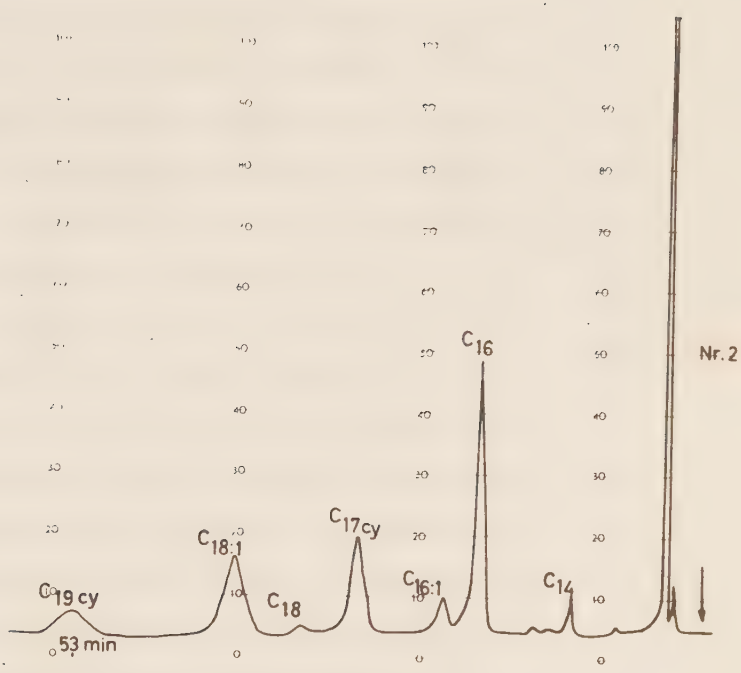
Peakbezeichnungen s. Seite 23/24

Escherichia coli:

Als Hauptbestandteil findet sich C_{16}, gefolgt von C_{17} cy (cy = Cyclopropanring), $C_{18:1}$ und C_{19} cy. THORNE und Mitarbeiter (1962) (112) zeigten bei gleicher Methodik, daß cyclopropanhaltige Fettsäuremethylester dieselben Retentionszeiten haben wie einfach ungesättigte Fettsäuren gleicher C-Atomzahl, z. B. entsprach C_{17cy} gaschromatographisch $C_{17:1}$. Ein C_{17cy} wurde bei E. coli von verschiedenen Autoren unabhängig voneinander beschrieben (95, 108, 109, 110, 11). VACZI (1965) (95) und KANESHIRO (1962) (107) fanden übereinstimmend bei E. coli ein C_{19cy}, das als "Lactobacillsäure" bezeichnet wurde. Eine Identifizierung dieser cyclopropanhaltigen Fettsäuremethylester mit Infrarot- oder Massenspektrometer im Anschluß an das Gaschromatogramm ist eine häufig angewendete Methode. Allerdings hätte sie den Rahmen der vorliegenden Arbeit überstiegen.

(Tabelle 8)

Tabelle 8



Gaschromatogramm von Escherichia coli

Peakbenennungen s. Seite 23/24

cy = cyclopropanhaltig

Säulentemperatur: 188°C

Durchflußrate: 68 ml/min

Probenmenge: 6 µl

Empfindlichkeit: 4 x

Papiervorschub: 0,2 inch/min

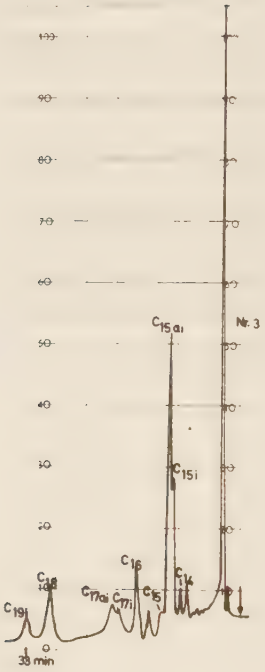
Staphylococcus aureus:

Hier fanden sich in absteigender Menge $C_{15anteiso}$, C_{15iso}, C_{18}, C_{16}, C_{19iso}, $C_{17anteiso}$. Der Index iso bzw. anteiso bezeichnet verzweigte Fettsäuren, wobei iso eine der endständigen CH_3-Gruppe benachbarte Verzweigung und anteiso nicht der endständigen CH_3-Gruppe benachbart bedeutet. In der Arbeit von ISHIZUKA (1966) und Mitarbeitern (96) zeigten Gaschromatogramme von St. aureus, die unter denselben Bedingungen wie in der vorliegenden Arbeit erhalten wurden, an den Stellen, wo bei eigenen Untersuchungen Peaks erschienen, Verbindungen, die als verzweigte Fettsäuremethylester identifiziert wurden, während ungesättigte Fettsäuremethylester fehlen. Auch MACFARLANE (1962) (117) fand in seinen Untersuchungen über den Fettgehalt von St. aureus nur verzweigte und keine ungesättigten Fettsäuren. Hiermit war es wahrscheinlich, daß es sich bei den Peaks, die nicht als gesättigte Fettsäuremethylester identifiziert werden konnten, um verzweigte Fettsäure-

methylester handelte, zumal die fraglichen Peaks im eigenen Chromatogramm in derselben Reihenfolge auftraten wie bei ISHIZUKA (96) und die Quotienten der Retentionszeiten von gesättigten und den fraglichen Verbindungen bei St. aureus nicht mit den entsprechenden Quotienten des Testchromatogramms von gesättigten und ungesättigten Estern übereinstimmten.

(Abbildung 9)

Abbildung 9



Gaschromatogramm von Staphylococcus aureus

Peakbenennungen s. Seite 23/24

iso = isoverzweigt, ai = anteisoverzweigt;

Säulentemperatur: 187°C

Durchflußrate: 71 ml/min

Probenmenge: 4 µl

Empfindlichkeit: 1 x

Papiervorschub: 0,1 inch/min

Streptococcus uberis:

Wie aus der Abb. 10 ersichtlich, sind die wesentlichen Komponenten C_{14}, C_{16}, $C_{18:1}$, mit kleineren Anteilen von $C_{14:1}$ und C_{18}.
(Abbildung 10)

Lactobacillus acidophilus:

C_{18} ist der überwiegende Anteil mit geringen Mengen von C_{14}, C_{16} und C_{19}.
(Abbildung 11)

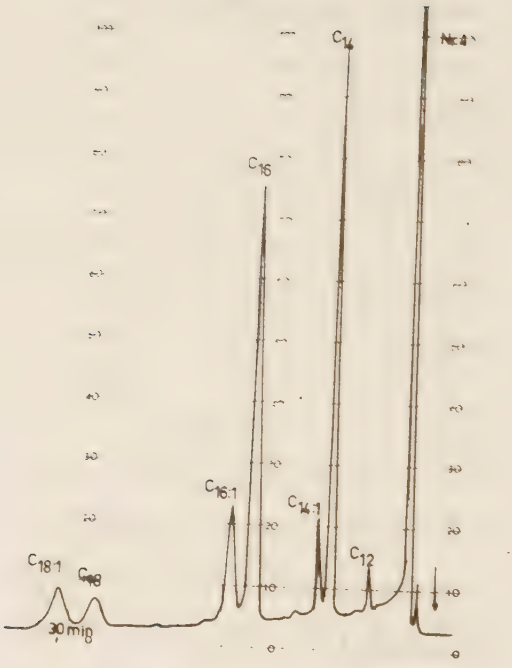
Corynebacterium diphtheriae:

Hier findet sich insofern eine Besonderheit, daß im Vergleich zu den übrigen untersuchten Arten Fettsäuren mit sechs C-Atomen auftreten. Die Hauptbestandteile sind C_{16}, C_{18} und $C_{18:1}$.
(Abbildung 12)

Bacillus subtilis:

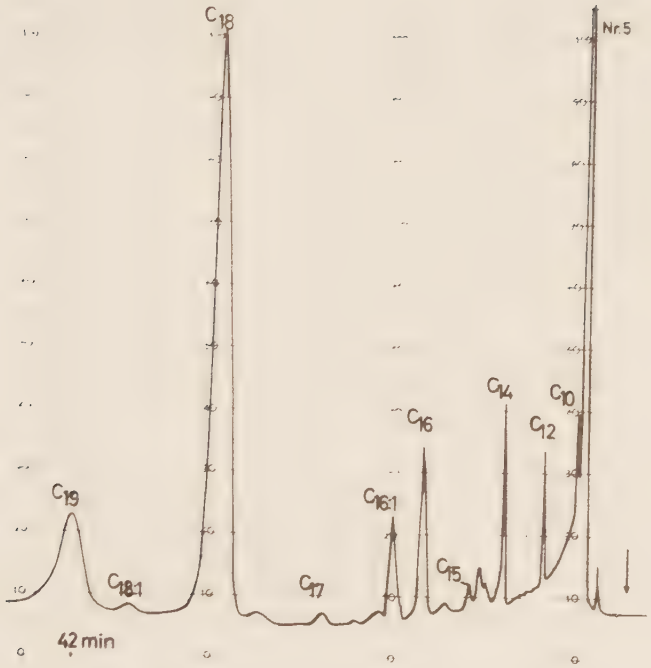
Ähnlich wie bei St. aureus zeigt B. subtilis anstatt ungesättigter Fettsäuren iso- und anteiso-verzweigte, wie aus den Arbeiten von KANEDA (1963) (115) und AKASHI (1960) (116) hervorgeht.
(Abbildung 13)

Abbildung 10



Gaschromatogramm von Streptococcus uberis
Peakbezeichnung s. Seite 23/24
Säulentemperatur: 187°C
Durchflußrate: 75 ml/min
Probenmenge: 5 µl
Empfindlichkeit: 2 x
Papiervorschub: 0,2 inch/min

Abbildung 11



Gaschromatogramm von Lactobacillus acidophilus

Peakbezeichnungen s. Seite 23/24

Säulentemperatur:	187 °C
Durchflußrate:	70 ml/min
Probenmenge:	3 µl
Empfindlichkeit:	1 x
Papiervorschub:	0,2 inch/min

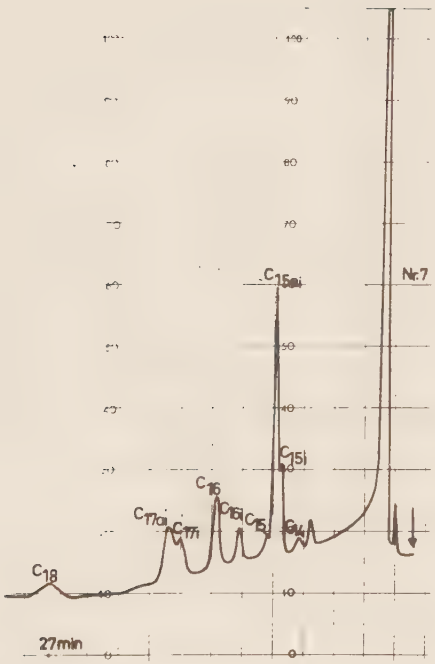
Abbildung 12

Gaschromatogramm von Corynebacterium diphtheriae

Peakbezeichnungen s. Seite 23/24

Säulentemperatur:	187° C
Durchflußrate:	92 ml/min
Probenmenge:	3 µl
Empfindlichkeit:	1 x
Papiervorschub:	0,2 inch/min

Abbildung 13



Gaschromatogramm von Bacillus subtilis

Peakbezeichnung s. Seite 23/24

Säulentemperatur: 187°C

Durchflußrate 74 ml/min

Probenmenge: 10 µl

Empfindlichkeit: 2 x

Papiervorschub: 0,2 inch/min

Indices: i = isoverzweigt, ai = anteisoverzweigt

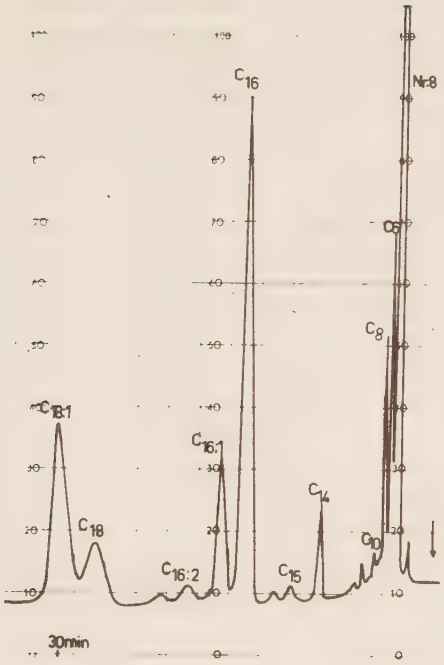
Nocardia rubra:

Wie auch C. diphth. zeigt N. rubra geringe Mengen kurzkettiger Fettsäuren, während der Hauptanteil von C_{16}, $C_{18:1}$ und C_{18} gebildet wird.
(Abbildung 14)

Rhodotorula mucilaginosa:

Die hier vorkommenden Fettsäuren beschränken sich in der Hauptsache auf die ungesättigten Verbindungen von C_{18}, also $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ und $C_{18:3}$. Von C_{16}, was bei den meisten der untersuchten Stämme in größeren Anteilen vorliegt, findet sich nur wenig.
(Abbildung 15)

Abbildung 14

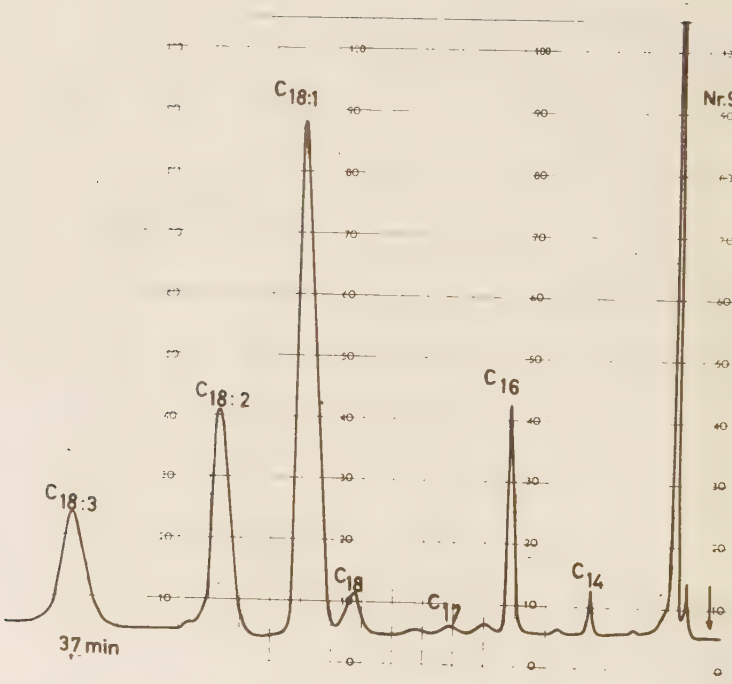


Gaschromatogramm von Nocardia rubra

Peakbezeichnungen s. Seite 23/24

Säulentemperatur:	187°C
Durchflußrate:	80 ml/min
Probenmenge:	5 µl
Empfindlichkeit:	8 x
Papiervorschub	0,2 inch/min

Abbildung 15



Gaschromatogramm von Rhodotorula mucilaginosa
Peakbezeichnungen s. Seite 23/24
Säulentemperatur: 187°C
Durchflußrate: 75 ml/min
Probenmenge: 2 µl
Empfindlichkeit: 2 x
Papiervorschub: 0,2 inch/min

Tabelle 2

Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren an der Gesamtfettsäuremenge bei den untersuchten Mikroorganismen.

Tabelle 2: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren an der Gesamtfettsäuremenge bei den untersuchten Mikroorganismen.

Angabe der C-Atome in den gefundenen Fettsäuren

Organismen	6	7	8	10	12	12:1	13	13i	14	14:1	14:2	15	15:1	15i	15ai
Ps. aer.									2			Sp			
E. coli						Sp			3	Sp		Sp			
St. aureus							Sp	2	2			2		14	34
Str. uberis					1				27	5		Sp			
L. acidophilus				Sp	1				5	Sp	Sp	Sp			
C. diphth.	16	Sp	1		1				5			1	1		
B. subtilis							2		1			3		11	36
N. rubra	3		2	Sp	Sp				4			Sp	Sp		
R. mucilaginosa									Sp						

Angabe der C-Atome in den gefundenen Fettsäuren

Organismen	16	16:1	16:2	16i	17	17:1	17i	17ai	17cy	18	18:1	18:2 = 19	18:3	19:1	19i	19cy
Ps. aer.	40	17			Sp	2				1	37			2		
E. coli	40	5							20	Sp	22					8
St. aureus	10			3			3	6		14					7	
St. uberis	40	12			Sp	3				6	8					
L. acidophilus	9	5			Sp					61	Sp	4				
C. diphth.	26	4			2					17	20					
B. subtilis	14			6			8	13		4						
N. rubra	37	12	1		1					10	28					
R. mucilaginosa	8	Sp			Sp					3	45	30	17			

Anmerkung:

Bei der Angabe der C-Atomzahlen bezeichnen die Zahlen nach dem Doppelpunkt die Zahl der Doppelbindungen. Die Indices i, ai und cy bedeuten: isoverzweigt, anteisoverzweigt und cyclopropanhaltig.

Sp: Spur, d. h. weniger als ein Prozent.

4. Diskussion

4.1. Theorien über Fettsäuresynthesen

Die folgenden Ausführungen stützen sich auf die zusammenfassende Darstellung von O'LEARY ((1967) (134)), wo sich auch Einzelheiten finden. Hier soll nur auf die verschiedenen Prinzipien eingegangen werden.

Der am häufigsten benutzte Weg zur Synthese der Fettsäuren ist der sogenannte "Malonyl-Weg". Hier wird zu Beginn von aktivierter Essigsäure (Acetyl-CoA) CO_2 aufgenommen und zu Malonyl-CoA umgewandelt. Unter Abspaltung von CO_2 kommt es zur Anlagerung eines weiteren Moleküls Acetyl-CoA oder anderer, mittels Coenzym A aktivierter Fettsäuren, wodurch eine ß-Ketosäure entsteht. Die weitere Kettenverlängerung ist im wesentlichen die Umkehrung der ß-Oxydation.

Die Synthese der ungesättigten Fettsäuren verläuft nicht, wie lange angenommen wurde, über die Dehydrierung der gesättigten Fettsäuren, sondern über die sogenannte "aerobe Synthese". Dabei werden ungesättigte, kurzkettige Vorstufen verlängert. Als solche kommen in Frage: $C_{10:1}$, $C_{12:1}$, $C_{14:1}$ und $C_{16:1}$. BLOCH u. Mitarbeiter haben in mehreren Arbeiten in den Jahren 1961 (138), 1962 (139) und 1964 (140) diese Synthese beschrieben. Einzelne Mikroorganismen, u. a. Bakterium megaterium, Corynbacterium diphtheriae und Micrococcus lysodeiktious haben eine andere Syntheseform: sie bilden die ungesättigten Fettsäuren über einen Energie verbrauchenden, aeroben Prozeß. Höhere ungesättigte Fettsäuren entstehen wahrscheinlich durch aerobe Synthese und kommen in höheren Mikroorganismen, Hefen, Pflanzen und Tieren vor, was auch in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt wird.

Die Synthese der cyclopropanhaltigen Fettsäuren erfolgt über ungesättigte Fettsäuren, die durch

Öffnen der Doppelbindung ein C_1-Bruchstück aufnehmen, das vom S-adenosyl-Methionin abgegeben wird.

Für die Synthese der verzweigten Fettsäuren sind drei Mechanismen bekannt:

1) Eine geradkettige Fettsäure wird mit Hilfe von Methionin methyliert.
2) Die verzweigte Kette von Valin, Leucin oder Isoleucin wird zur Synthese verwendet.
3) Im Metabolismus der Propionsäure findet sich Methyl-Malonyl-Coenzym A mit verzweigter Kette, was dann zur Synthese anderer verzweigter Fettsäuren verwendet werden kann.

Mit Ausnahme des ersten Mechanismusses wird die verzweigte Vorstufe in die unverzweigte Fettsäure aufgenommen, die auf dem "Malonyl-Weg" synthetisiert wurde.

Im Zusammenhang mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Untersuchung kann man sagen, daß der "Malonylweg" zur Synthese der Fettsäuren offensichtlich der am häufigsten benutzte ist, was

sich in dem starken Übergewicht der geradkettigen, geradzahligen Fettsäuren zeigt. Auch die großen Anteile der ungeradzahligen Fettsäuren bei St. aureus und B. subtilis stehen dazu in keinem Widerspruch. Faßt man nämlich die verzweigten Fettsäuren entsprechend ihrer Synthese als methylierte geradzahlige Fettsäuren auf, so herrschen sie in derselben Form bei St. aureus und B. subtilis vor, wie es die geradzahligen, nichtmethylierten Fettsäuren bei den anderen untersuchten Mikroorganismen tun.

4.2. Vergleiche der eigenen Ergebnisse mit dem Schrifttum

Vergleiche, besonders quantitativer Art, zwischen eigenen Ergebnissen und denen anderer Autoren sind problematisch. Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, haben Vergleiche nur dann Aussagewert, wenn die biologischen und chemischen Methoden und die untersuchten Arten von Mikroorganismen identisch sind. Wenn allerdings mehrere

Autoren mit vergleichbaren Untersuchungsmethoden unabhängig voneinander zu ähnlichen Ergebnissen kommen, scheint es gerechtfertigt zu sein, diese Ergebnisse mit den eigenen unter Beachtung der in der Einleitung erwähnten Faktoren, die eine Änderung in der Fettsäureverteilung hervorrufen, in Beziehung zu setzen.

In den folgenden Tabellen werden die eigenen Ergebnisse den Resultaten aus dem Schrifttum gegenübergestellt, die mit vergleichbaren Nachweismethoden ermittelt wurden.

Anmerkung zu den Tabellen 3 - 11:

Die Zahlen der ersten Reihe bezeichnen die Anzahl der C-Atome und die Anzahl der Doppelbindungen (Zahl nach dem Doppelpunkt). In den Tabellen nicht erwähnte Verbindungen werden weder in den eigenen noch in fremden Untersuchungen gefunden.

Die Buchstaben nach dem Doppelpunkt bedeuten:

br: verzweigt i: isoverzweigt

ai: anteisoverzweigt cy: cyclopropanhaltig.

+: Fettsäure findet sich bei den eigenen Ergebnissen und wird im Schrifttum ebenfalls gefunden.

(+): Fettsäure findet sich bei den eigenen Ergebnissen, wird aber im Schrifttum nicht bestätigt.

-: Fettsäure findet sich nicht bei den eigenen Ergebnissen, wird jedoch im Schrifttum erwähnt.

Die Zahlen in den senkrechten Spalten bezeichnen die Nummer der Literaturstelle im Literaturverzeichnis auf Seite 103 , wo die entsprechende Fettsäure erwähnt wird.

Tabelle 3

Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse bei Pseudomonas aeruginosa mit den Ergebnissen im Schrifttum.
(Anmerkung s. Text Seite 60/61)

14	14:1	15	15:1	16	16:1	17	17:1
+	-	+	-	+	+	+	+
106	113	106	114	106	106	106	114
113		113		113	113	114	
114		114		114	114		

18	18:1	18:2	18:br	19:1	19:br
+	+	-	-	+	-
106	106	113	114	113	114
113	113				
	114				

Tabelle 4

Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse bei E. coli mit den Ergebnissen im Schrifttum
(Anmerkung s. Seite 60/61)

12	12:1	14	14:1	15	15:br	16	16:1
-	(+)	+	+	+	-	+	+
95		95	106	95	95	93	95
		106		106	106	95	106
		107				107	107
		108				108	108
		109				109	
		111					

17	17:cy	17:br	18	18:br	18:1	19	19:cy
-	+	-	+	-	+	-	+
93	108	95	93	95	106	93	107
108			106		107		
			109				

Tabelle 5

Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse bei Staphylococcus aureus mit den Ergebnissen im Schrifttum.
(Anmerkung s. Seite 60/61)

13	13:i	14	14:i	14:ai	15	15:i	15:ai	16
(+)	(+)	+	-	-	+	+	+	+
		96	96	117	96	96	96	96
						117		117

16:i	17	17:i	17:ai	18	18:i	19	19:i	20
-	-	-	+	-	-	-	(+)	-
96	96	96	96	96	96	96		96
		117	117	117				117

Tabelle 6

Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse bei Streptococcus uberis mit den Ergebnissen im Schrifttum.
(Anmerkung s. Seite 60/61)

12	12:1	13	14	14:1	15	15:br	16
+	-	(+)	+	+	+	-	+
118	121		118	118	118	118	118
				121			

16:br	16:1	17	17:1	17:br	18	18:1	18:2
-	+	+	+	-	+	+	-
118	118	118	118	118	118	118	118

Tabelle 7

Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse bei Lactobacillus acidophilus mit den Ergebnissen im Schrifttum.
(Anmerkung s. Seite 60/61)

10	12	12:1	14	14:1	14:2	15	16
(+)	+	-	+	(+)	(+)	+	+
	112	112	112			112	112

16:1	17	17:1	18	18:1	19
+	(+)	-	+	+	(+)
112		112	112	112	

Tabelle 8

Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse bei Corynebacterium diphtheriae mit den Ergebnissen im Schrifttum.

(Anmerkung s. Seite 60/61)

6	7	8	12	14	15	15:1	16
(+)	(+)	(+)	+	+	+	(+)	+
			98	102	98		102
			132	132			98
							132

16:1	17	18	18:1
+	(+)	+	+
102		98	102
		132	

Tabelle 9

Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse bei Bacillus subtilis mit den Ergebnissen im Schrifttum.
(Anmerkung s. Seite 60/61)

13	14	14:i	15	15:br	15:i	15:ai	16
(+)	+	-	+	+	+	+	+
	115	115	115	116	115	115	115
	102			102			102

16:1	16:i	17	17:br	17:i	17:cy	17:ai	18
-	+	-	+	+	-	+	(+)
102	115	115	102	115	102	115	

Tabelle 10

Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse bei Nocardia rubra mit den Ergebnissen im Schrifttum.
(Anmerkung s. Seite 60/61)

6	8	10	12	14	15	15:1	16
(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	(+)	+
				119	119		119

16:1	16:2	17	17:1	18	18:1	19
+	(+)	+	-	+	+	-
119		119	119	119	119	119

Tabelle 11

Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse bei Rhodotorula mucilaginosa mit den Ergebnissen im Schrifttum. (Anmerkung s. Seite 60/61)

11	12	13	14	16	16:1	17	18
-	-	-	+	–	–	–	–
120	120	120	120	120	120	120	120

18:1	18:2	18:3	19:1	20:1
+	+	+	-	-
120	120	120	120	120

4.3. Vergleiche der Gaschromatogramme untereinander

Bei qualitativen und quantitativen Vergleichen der einzelnen Gaschromatogramme ergaben sich deutliche Unterschiede. Die Signifikanz der quantitativen Unterschiede wurde mittels des WILCOXON-Testes (124) festgestellt. Der besseren Übersicht halber findet sich eine graphische Darstellung der Fettsäureverteilung bei den einzelnen Mikroorganismen in den folgenden Abbildungen.

Anmerkung zu den Abbildungen 16 - 24

Auf der Abszisse sind die Fettsäuren mit ihren Abkürzungen, die denen auf Seite 55 entsprechen, aufgetragen.
Die Ordinate zeigt die Prozentbeträge der einzelnen Fettsäuren an der Gesamtfettsäuremenge.

Der Vergleich der Chromatogramm wurde nach zwei Gesichtspunkten durchgeführt:

1) Bei welchen Chromatogrammen besteht eine Ähnlichkeit im Verhältnis von C_{14}:C_{16}:C_{18} als häufigsten Fettsäuren ?

2) Unterschieden sich in der Verteilung von C_{14}, C_{16} und C_{18} ähnliche Chromatogramme qualitativ oder signifikant quantitativ voneinander ?

Im folgenden Text werden also nur die Bakterien gegenübergestellt, deren Chromatogramme gemäß dem ersten Gesichtspunkt ähnlich sind, und dann wird die zweite Frage nach einer Unterscheidungsmöglichkeit dieser ähnlichen Chromatogramme beantwortet.

E. coli (Abb. 17) und Ps. aer. (Abb. 16) ähneln sich im Verhältnis von C_{14}:C_{16}:C_{18}
(E. coli: 1:13:0,3; Ps. aer.: 1:20:0,5).
Deutliche Unterschiede zeigen sich im Verhältnis von C_{16}:$C_{16:1}$
(E. coli: 7:1; Ps. aer.: 2,4:1) und im Auftreten einer C_{17cy}- und C_{19cy}-Fettsäure bei E. coli.

(Abbildung 16 und Abbildung 17)

Abbildung 16

Fettsäureverteilung bei Ps. aer.

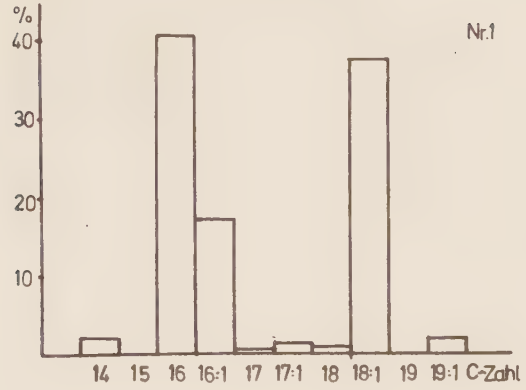
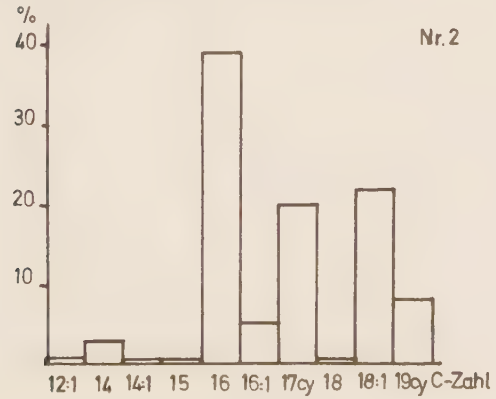


Abbildung 17

Fettsäureverteilung bei E. coli



Ebenfalls ähnlich sind sich St. aureus (Abb. 18) und C. diphth. (Abb. 19)
(St. aureus: 1:4:6; C. diphth.: 1:6:4).
Unterschiede zeigen sich durch den Anteil von kurzkettigen Fettsäuren (C_6 und C_8) bei C. diphth., außerdem zeigt St. aureus verzweigte Fettsäuren als Hauptbestandteil.

(Abbildung 18 und Abbildung 19)

Abbildung 18

Fettsäureverteilung bei St. aureus

(Anmerkung s. Seite 71/72)

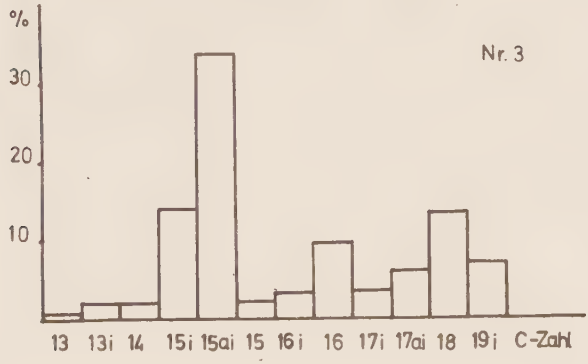
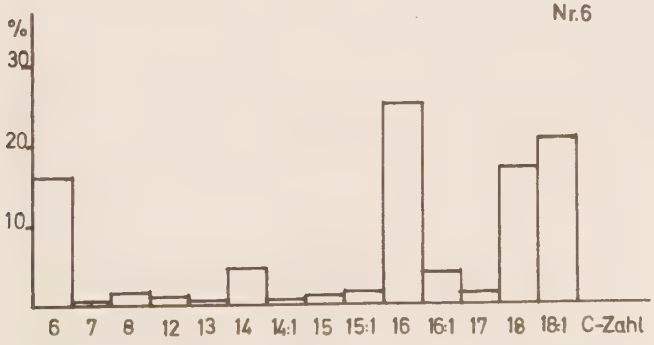


Abbildung 19

Fettsäureverteilung bei C. diphth.

(Anmerkung s. Seite 71/72)



Ein ähnliches Verhältnis der geradzahligen Fettsäuren C_{14}, C_{16} und C_{18} zeigen B. subtilis (Abb. 20) und N. rubra (Abb. 21) (B. subtilis: 1:14:4; N. rubra: 1:10:3), sie unterscheiden sich jedoch im Hauptanteil von verzweigten Fettsäuren bei B. subtilis und dem großen Anteil von $C_{18:1}$ bei N. rubra.

(Abbildung 20 und Abbildung 21)

Abbildung 20

Fettsäureverteilung bei B. subtilis

(Anmerkung s. Seite 71/72)

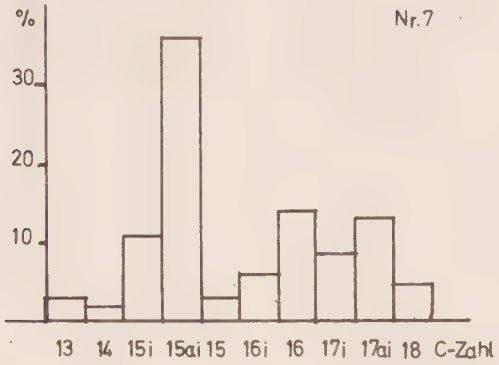
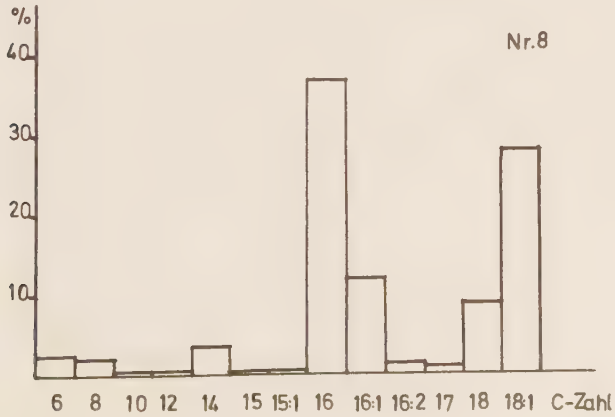


Abbildung 21

Fettsäureverteilung bei N. rubra

(Anmerkung s. Seite 71/72)



Str. uberis (Abb. 22), L. acidophilus (Abb. 23) und R. mucilaginosa (Abb. 24) ähneln sich weder im C_{14}:C_{16}:C_{18}-Verhältnis noch im Verhältnis der geradzahligen Fettsäuren zu ihren ungesättigten Homologen.

Abbildung 22

Fettsäuren bei Str. uberis

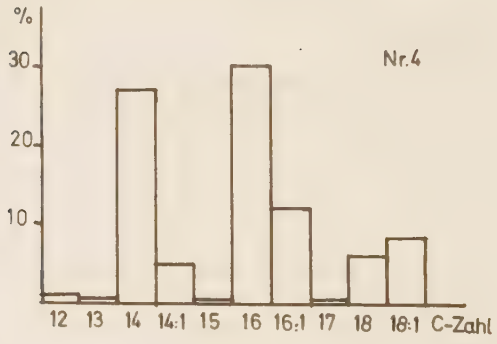


Abbildung 23

Fettsäuren bei L. acidophilus

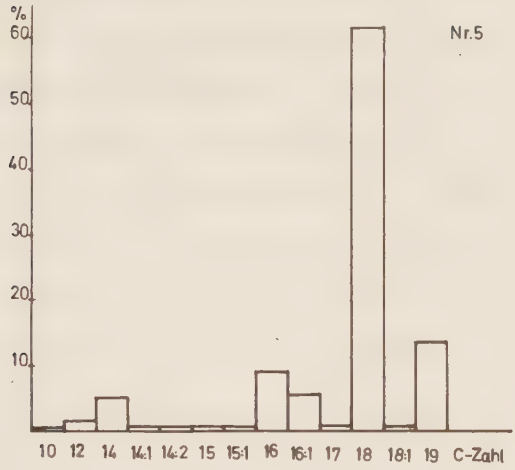
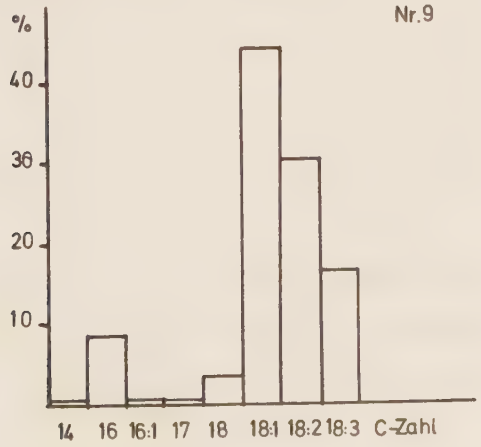


Abbildung 24

Fettsäuren bei R. mucilaginosa



Beim Vergleich der Gaschromatogramme von St. aureus (Abb. 18) und B. subtilis (Abb. 20), welche beide verzweigte Fettsäuren als Hauptbestandteil aufweisen, zeigt sich ein unterschiedliches C_{14}:C_{16}:C_{18}-Verhältnis (St. aureus: 1:5:7; B. subtilis: 1:14:4). Eine Ähnlichkeit besteht jedoch im Verhältnis von C_{15i}:C_{15ai} (St. aureus: 1:2,4; B. subtilis: 1:3) und C_{17i}:C_{17ai} (St. aureus: 1:2,0; B. subtilis: 1:1,6).

Ähnlichkeiten in der Qualität der Fettsäuren zeigen sich zwischen N. rubra und C. diphth. (Abb. 19 und 21). Bei beiden treten kurzkettige Fettsäuren auf, die bei den anderen untersuchten Keimen fehlen. Unterschiede zeigen sich allerdings im Verhältnis von C_{16}:$C_{16:1}$ (C. diphth.: 8:1; N. rubra: 3:1) und von C_{18} zu $C_{18:1}$ (C. diphth.: 1:1; N. rubra: 1:3).

Betrachtet man die Fettsäureverteilung von Str. uberis und L. acidophilus (Abb. 22 und 23), die in BERGEY's Manual in einer Familie zusam-

mengefaßt sind, so ergeben sich deutliche Unterschiede. Während bei Str. uberis das Gewicht auf C_{14}, C_{16} und $C_{18:1}$ liegt, zeigt L. acidophilus hauptsächlich einen C_{18}-Peak. Auch das Verhältnis der geradzahligen Fettsäuren C_{14}, C_{16} und C_{18} ist sehr verschieden (Str. uberis: 1:1,4:0,2; L. acidophilus: 1:2:12). Diese Verschiedenheiten mögen ein Anlaß sein für weitere Untersuchungen mit der Fragestellung, ob L. acidophilus und Str. uberis tatsächlich in einer Familie zusammengefaßt werden können.

Neben den Unterschieden der untersuchten Mikroorganismen im Verhältnis der geradzahligen Fettsäuren zueinander und im Verhältnis der geradzahligen Fettsäuren zu ihren ungesättigten Homologen bestehen außerdem große quantitative Unterschiede, wie ein Vergleich der Säulendarstellung in den Abbildungen 16 - 24 leicht erkennen läßt. Daraus ergibt sich, daß jeder der untersuchten Stämme sein individuelles, d. h. unverwechselbares Chromatogramm zeigt.

In der folgenden Tabelle werden die untersuchten Organismen nach ihrer Ähnlichkeit entweder im C_{14}:C_{16}:C_{18}-Verhältnis oder im C_{15i}:C_{15ai}-Verhältnis auf der linken Seite zusammengefaßt, während sich auf der rechten Seite die Unterscheidungsmöglichkeiten der ähnlichen Mikroorganismen finden.

(Tabelle 12)

Allerdings kann sich erst aus weiteren Untersuchungen mit verschiedenen Arten einer Gattung und verschiedenen Stämmen einer Art erweisen, ob bei Kulturen, die unter gleichen Bedingungen gewonnen wurden, die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung eine Unterscheidung von Arten und Gattungen ermöglicht.

Tabelle 12

Zusammenfassung der untersuchten Mikroorganismen nach Ähnlichkeit und Unterschieden in ihrer Fettsäureverteilung.

Ähnlichkeit		Unterschiede
a) im C_{14}:C_{16}:C_{18}-Verhältnis		
Ps. aer.	(1:20:0,5)	C_{16}:$C_{16:1}$ (Ps. aer. 2,4:1) (E. coli 7 :1)
E. coli	(1:13:0,3)	C_{17cy} und C_{19cy} bei E. coli
St. aureus	(1:4:4)	verzweigte Fettsäuren bei St. aureus; kurzkettige Fettsäuren bei C. diphth.
C. diphth.	(1:6:4)	
B. subtilis	(1:14:4)	verzweigte Fettsäuren bei B. subtilis; hoher $C_{18:1}$-Anteil bei N. rubra; hohe Anteile von $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ und $C_{18:3}$ bei R. mucilaginosa
N. rubra	(1:10:3)	
R. mucilaginosa	(1:8:3)	
b) im C_{15i}:C_{15ai}- und C_{17i}:C_{17ai}-Verhältnis		
B. subtilis	(1:3 und 1:1,6)	im C_{14}:C_{16}:C_{18}-Verhältnis (B. subtilis 1:14:4) (St. aureus 1: 5:7)
St. aureus	(1:2 und 1:2)	

5. Zusammenfassung

Es wurden die Fettsäuren der Chloroform-Dichlormethanextrakte von neun Stämmen der Mikroorganismen verschiedener Familien untersucht. Die Keime wurden auf dem gleichen Nährboden kultiviert und beim Übergang von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase geerntet. Nach der Verseifung des Extraktes wurden die Fettsäuren nach ihrer Überführung in die Methylester mittels methanolischer Bortrifluoridlösung im Gaschromatographen getrennt. Jede der untersuchten Arten zeigte ein individuelles Chromatogramm, woraus sich die Möglichkeit ergibt, über die Fettsäurezusammensetzung eine chemisch definierte Unterscheidung der untersuchten Organismen zu treffen. Jedoch sind Aussagen über Klassifizierungsmöglichkeiten erst dann möglich, wenn die Fettsäureverteilung mehrerer Arten und Gattungen, die unter denselben Bedingungen gezüchtet und chemisch behandelt wurden, untersucht sind.

6. Literaturverzeichnis

93) ABEL, K. de SCHMERTZING, H. u. PETERSON, J.I.: Classification of Mikroorganisms by Analysis of the chemical Composition. I. Feasibility of Utilizing Gaschromatography. J. Bacteriol. 85: 1039-44 (1963).

116) AKASHI, S. u. SAITO, K.: A branched saturated C_{15} Acid (Sarcinic Acid) from Sarcina Phospholipids and a similar Acid from several microbial Lipids. J. Biochem. 47: 222-26 (1960).

129) ALBRO, P.W. u. HUSTON, Ch.K.: Lipids of Sarcina lutea. II. Hydrocarbon content of the Lipid Extract. J. Bacteriol. 88: 981-86 (1964).

67) ALIMOWA, J.K.: Die gebundenen Lipide der Diphtheriemikroben. Biochemie 22: 933-41 (1957), Ref.: Chem. Zbl. 1958: 8088

72) ALIMOWA, J.K.: Die Verteilung der Lipide zwischen Zellmembran und übrigen Bestandteilen der Zelle von Diphtheriebakterien. Biochemie 23: 205-11 (1958), Ref.: Chem. Zbl. 1958: 13 815.

86) ALIMOWA, J.K: Über die Oberflächenschicht der Zellen und ihre toxischen Lipide von Diphtheriebakterien. Biochemie 24: 785-88 (1959), Ref.: Chem. Zbl. 1960: 6882.

87) ALIMOWA, J.K.: Der mit Benzol extrahierte Lipoidkomplex aus Diphtheriemikroben. Biochemie 24: 657-60 (1959), Ref.: Chem. Zbl. 1960: 2920.

1) ANDERSON, R. J. u. BURT, M. L.: Analyse des acetonlöslichen Fettes der bovinen Tuberkelbakterien. J. Biol. Chem. 94: 431-36 (1931), Ref.: Chem. Zbl. 1932/I: 2338.

2) ANDERSON, R. J. u. PANGBORN, M. C.: Zusammensetzung der Phosphtidfraktion der Timotheegrasbakterien. J. Biol. Chem. 94: 465-72 (1931), Ref.: Chem. Zbl. 1932/I: 2339.

3) ANDERSON, R. J. u. NAO UYEI: Trennung der Lipoidfraktion der Leprabakterien. J. Biol. Chem. 94: 653-60 (1931), Ref.: Chem. Zbl. 1932/I: 2339.

6) ANDERSON, R. J.: Besprechung gewisser Fettbestandteile säurefester Bakterien. Ann. Rev. Tuberculosis 24: 746-50 (1931), Ref.: Chem. Zbl. 1932/I: 3107.

8) ANDERSON, R. J.: Die Chemie der Lipoide der Tuberkelbakterien. Physiol. Rev. 12: 166-89 (1932), Ref.: Chem. Zbl. 1932/II: 3429.

9) ANDERSON, R. J. u. NAO UYEI: Die Zusammensetzung der Phosphtidfraktion der Leprabakterien. J. Biol. Chem. 97: 617-37 (1934), Ref.: Chem. Zbl. 1934/I: 1510.

10) ANDERSON, R. J.: Über die Phtionsäure. J. Biol. Chem. 97: 639-750 (1934), Ref.: Chem. Zbl. 1934/I: 1510.

20) ANDERSON, R. J. u. PANGBORN, M. C.: Die Chemie der Lipoide von Tuberkelbacillen. Die Zusammensetzung von Timotheebacillenwachs J. Am. chem. Soc. 58: 10-24 (1936), Ref.: Chem. Zbl. 1938/I: 2198

22) ANDERSON, R.J., CROWDER, J.A., NEWMAN, M.S. u. STODOLA, F.H.: Die Chemie der Lipoide von Tuberkelbakterien. Die Zusammensetzung von Leprosin. J. Biol. Chem. 113: 637-47 (1936), Ref.: Chem. Zbl. 1938/I: 2199.

23) ANDERSON, R.J., CROWDER, J.A., STODOLA, F.H. u. PANGBORN, M.C.: Die Chemie der Lipoide von Tuberkelbacillen. Vergleichende Untersuchungen der Lipoide des menschlichen Tuberkelbacillus. J. Am. chem. Soc. 58: 636-42 (1936), Ref.: Chem. Zbl. 1938/I: 2199.

24) ANDERSON, R.J., CROWDER, J.A. u. STODOLA, F.H.: Die Chemie der Lipoide von Tuberkelbacillen. Isolierung von alpha- und beta-Leprosol. J. Biol. Chem. 114: 431-39 (1936), Ref.: Chem. Zbl. 1938/I: 2200.

25) ANDERSON, R.J. u. REEVES, R.E.: Die Chemie der Tuberkelbacillen. J. Am. chem. Soc. 59:858-61 (1937), Ref.: Chem. Zbl. 1938/II: 1430.

26) ANDERSON, R.J. u. REEVES, R.E.: Die Chemie der Tuberkelbacillenlipide. Vorkommen von Phtiocerol im Wachs verschiedener Stämme des menschlichen Tuberkelbacillus. J. Biol. Chem. 119: 535-41 (1937), Ref.: Chem. Zbl. 1938/II: 3255.

27) ANDERSON, R.J. u. REEVES, R.E.: Die Chemie der Tuberkelbacillenlipide. Colorimetrische Bestimmungen von Phtiocerol. J. Biol. Chem. 119: 543-47 (1937), Ref.: Chem. Zbl. 1938/II: 3255.

28) ANDERSON, R.J. u. CASON, J.: Die Chemie der Tuberkelbacillenlipide. Vorkommen von Phthiocerol im Wachs der Rindertuberkelbacillen. J. Biol. Chem. 119: 549-51 (1937), Ref.: Chem. Zbl. 1938/II: 3255.

30) ANDERSON, R.J., REEVES, R.E. u. STODOLA, F.H.: Die Chemie der Tuberkelbacillenlipide. Betrifft festgebundene Lipide des menschlichen Tuberkelbacillus. J. Biol. Chem. 121 649-68 (1937), Ref.: Chem. Zbl. 1939/I: 975.

31) ANDERSON, R.J., REEVES, R.E. u. CROWDER, J.A.: Die Chemie der Tuberkelbacillenlipide. Die Zusammensetzung des acetonunlöslichen Fettes von Bac. leprae. J. Biol. Chem. 121: 669-84 (1937), Ref.: Chem. Zbl. 1939/I: 975.

32) ANDERSON, R.J., LOTHROP, W.C. u. CREIGHTON, M.M.: Die Chemie der Tuberkelbacillenlipide. Studien am Phosphatid des menschlichen Tuberkelbacillus. J. Biol. Chem. 125: 299-308 (1938), Ref.: Chem. Zbl. 1939/I: 2796.

33) ANDERSON, R.J., STODOLA, F.H. u. LESUK, A.: Die Chemie der Tuberkelbacillen. Isolierung und Eigenschaften der Mykolsäure. J. Biol. Chem. 126: 505-13 (1938), Ref.: Chem. Zbl. 1939/II: 2797.

34) ANDERSON, R.J. u. WIEGHARD, Ch.W.: Die Chemie der Lipide der Tuberkelbacillen. Untersuchungen an den Wachsfraktionen des menschlichen Tuberkelbacillus. J. Biol. Chem. 126: 515-26 (1938), Ref.: Chem. Zbl. 1939/II: 2797.

35) ANDERSON, R.J. u. CASON, J.: Die Chemie der Lipide der Tuberkelbacillen. Das Wachs des Rindertuberkelbacillus. J. Biol. Chem. 126: 527-41 (1938), Ref.: Chem. Zbl. 1939/II: 2797.

37) ANDERSON, R.J. u. CREIGHTON, M.M.: Die Chemie der Lipide von Tuberkelbacillenwachs. J. Biol. Chem. 129: 57-63 (1939), Ref.: Chem. Zbl. 1939/II: 2087.

39)	ANDERSON, R. J. u. GEIGER, W. B.:	Die Chemie der Lipide von Tuberkelbacillen. Festgebundene Lipide der sogenannten Leprosebacillen. J. Biol. Chem. 131: 539-49 (1939), Ref.: Chem. Zbl. 1940/I: 2004.
40)	ANDERSON, R. J. u. GEIGER, W. B.:	Die Chemie von phytomonas tumefaciens, Zusammensetzung der Phosphatide. J. Biol. Chem. 129: 519-29 (1939), Ref.: Chem. Zbl. 1940/I: 729.
46)	ANDERSON, R. J.:	Struktureigentümlichkeiten von säurefesten Bakterienlipoiden. Chem. Reviews 29:225-43 (1941), Ref.: Chem. Zbl. 1943/I: 41.
42)	ANDERSON, R. J., PECK, R. L. u. CREIGHTON, M. M.:	Die Chemie der Lipoide von Tuberkelbakterien. Polysaccharid des Phosphatids. J. Biol. Chem. 136: 211-27 (1940), Ref.: Chem. Zbl. 1941/I: 2261.
102)	ASSELINEAU, J.:	Les Lipides bactériens. Herman, Paris, 1962.
108)	ASSELINEAU, J.:	Sur quelques Applications de la Chromatographie en phase gazeuse à l'étude d'acides gras bactériens. Ann. Inst. Past. 100:109-19 (1961).
128)	BALLIO, A., BARCELLONA, S. u. BONIFORIT, L.:	The Component Fatty Acids of Lipids from som Streptomyces spp. Biochem. J. 94: 11c-13c (1965).
125)	BAWDON, R. E. u. BASSETTE, R.:	Differentiation of E. coli and aerobacter aerogenes by Gas-Liquid Chromatography. J. Dairy Sci. 49: 624-27 (1966).

138)	BLOCH, K., BARANOWSKY, P., GOLDFINE, H., LENNARZ, W.J., LIGHT, R., NORRIS, A.T. u. SCHEUERBRANDT, G.:	Biosynthesis and Metabolism of Unsaturated Fatty Acids. Federation Proc. 20:921-27 (1961).
139)	BLOCH, K. u. SCHEUERBRANDT, G.:	Unsaturated Fatty Acids in Microorganisms. J. Biol. Chem. 237: 2064-68 (1962).
140)	BLOCH, K. u. ERWIN, J.:	Biosynthesis of Unsaturated Fatty Acids in Microorganisms. Science 143: 1006-1012 (1964).
7)	BOISSEVAIN, C.H. u. RYDER, C.T.:	Einige Beobachtungen über chemische und biologische Eigenschaften des Phosphatids der Tuberkelbakterien. Ann. Rev. Tuberculosis 24: 751-56 (1931), Ref.: Chem. Zbl. 1932/II: 3108.
84)	BOLGOWA, G.D., ALIMOWA, J.K. u. MOISSEJENKO, N.D.:	Die Proteolipidfraktionen einiger Brucellenlipide. Ukrain. biochem. J. 32: 87-92 (1960), Ref.: Chem. Zbl. 1960: 11 344.
119)	BORDET, C. u. MICHEL, G.:	Etudes des Acides gras isolés de plusieurs espèces de Nocardia. Biochim. Biophy. Acta 70: 613-26 (1963).
36)	BUTENANT, A. u. STODOLA, F.H.:	Zur Kenntnis von alpha- und beta-Leprosol bei Bac. leprae. Liebigs Ann. Chem. 539: 40-59 (1938), Ref.: Chem. Zbl. 1939/II: 2087.

77)	CASON, J., ALLEN, C.F., DeACETIS, W. u. FONKEN, G.J.:	Fettsäuren aus den Lipiden nichtvirulenter Tuberkelbakterien. J. Biol. Chem. 220:893-904 (1956), Ref.: Chem. Zbl. 1959: 16 684.
81)	CASON, J. u. FONKEN, G.J.:	Der komplexe Charakter des Gemisches höherer Fettsäuren aus den Lipiden des Tuberkelbazillus. J. Biol. Chem. 220:391-405 (1956), Ref.: Chem. Zbl. 1959: 10 869.
5)	CHARGAFF, E.:	Über die Lipoide der Diphtheriebakterien. Zschr. physiol. Chem. 201: 191-207 (1931), Ref.: Chem. Zbl. 1932/I: 1112.
11)	CHARGAFF, E. u. DIERYCK, J.:	Über den Lipoidgehalt verschiedener Typen von Tuberkelbakterien. Biochem. Zschr. 255:319-29 (1934), Ref.: Chem. Zbl. 1934/I: 1510.
12)	CHARGAFF, E.:	Über die Lipide des Bacillus Calmette-Guérin (BCG). Hoppe Seyler's Z. phys. Chem. 217: 115-37 (1933), Ref.: Chem. Zbl. 1934/I: 2299.
13)	CHARGAFF, E.:	Über das Fett und Phosphtid der Diphtheriebakterien. Hoppe Seyler's Z. phys. Chem. 218: 223-40 (1933), Ref.: Chem. Zbl. 1934/I: 229.
29)	CHARGAFF, E. u. LEVINE, M.:	Die Lipide von Bacterium Tumefaciens. J. Biol. Chem. 124: 195-205 (1938), Ref.: Chem. Zbl. 1939/I: 695.
106)	CHO, K.Y. u. SALTON, M.R.J.:	Fatty Acid Composition of Bacterial Membrane and Wall Lipids. BiochimBiophys. Acta 116: 73-79 (1966).

44) CINCA, M. u. MESROBEANU, L.: Chemisch-physikalische Eigenschaften des Zucker-Lipoidantigens von Proteus X_{19}.
Bull. Sect. Sci. Acad. roum. 23: 310-320 (1941),
Ref.: Chem. Zbl. 1942/II: 1803.

53) CMELIK, S.: Die Lipide von Salmonella ballerup.
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 293: 222-29 (1953),
Ref.: Chem. Zbl. 1954: 6030.

54) CMELIK, S.: Die Lipide von Salmonella typhi.
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 290: 146-50 (1952),
Ref.: Chem. Zbl. 1954: 3720.

56) CMELIK, S.: Lipide und Virulenz bei Typhusbakterien.
Experientia (Basel) 10: 372-73 (1954),
Ref.: Chem. Zbl. 1955: 8183.

60) CMELIK, S.: Zur Kenntnis der Lipoide von Typhusbakterien.
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 299: 227-34 (1955),
Ref.: Chem. Zbl. 1957: 13 386.

61) CMELIK, S.: Einfluß verschiedener Nährlösungen auf die Lipoidverteilung von Corynebacterium diphtheriae.
Schweizer Z. all. Pathol. Bacteriol. 17: 289-95 (1954),
Ref.: Chem. Zbl. 1957: 13 386.

88) CMELIK, S.: Untersuchungen verschiedener Lipoidfraktionen von Salmonella paratyphi C.
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 296: 67-73 (1954),
Ref.: Chem. Zbl. 1955: 9118.

85)	DAUNDRY, S. u. ASSELINEAU, J.:	Über die Fettsäuren der Lipide von E. voli. C. R. hebd. Séances Acad. Aci. 250: 2635-37 (1960), Ref.: Chem. Zbl. 1960: 12036.
111)	DAUNDRY, S. u. ASSELINEAU, J.:	C. R. Acad. Sci. 250: 2635-37 (1960).
135)	De LEY, J.:	Pseudomonas and related Genera. Ann. Rev. Microbiol. 18: 17-24 (1964).
124)	Documenta Geigy:	Wissenschaftliche Tabellen, 6. Aufl. J. R. Geigy A. G. Pharmazeutische Abteilung (Basel) 1960.
49)	DUBROWSKAJA, I. I.:	Abtrennung, Reinigung und chemische Charakteristik der Brucella-Antigene. Biochimia 15: 490-94 (1950), Moskau, Ref.: Chem. Zbl.: 1951/I, 3:2306.
73)	DUBROWSKAJA, I. I., OSSTROWSKAJA, N. N. u. GLUBOKINA, A. J.:	Die Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Brucellen unter Phageneinfluß. Biochemie 23: 523-26 (1958), Ref.: Chem. Zbl. 1959: 3862
104)	ENDRES, J. G.:	An Apparatus for the Rapid Preparation of Fatty Acid Esters from Lipids for Gaschromatographic Analysis. J. Am. Oil Chem. Soc. 43:600 (1966).
15)	FRANCIOLI, M.:	Die Lipidverteilung des Tuberkelbacillus. R. ist. lombardo Sci. Lettre, Rend. (2)67: 737-40 (1934)Mailand, Ref.: Chem. Zbl. 1935/I: 3943.

69) FREEMAN, N.K., LINDGREN, F.T., NG, Y.C. u. NICHOLS, A.V.: Chromatographische Serumlipidanalyse und IR-Spectrometrie. J. Biol. Chem. 227: 449-64 (1957), Ref.: Chem. Zbl. 1958: 223.

68) GASTAMBIDE-ODIER, M.M., SMITH, D.W., RANDALL, H.M. u. KOEVOET, A.O.: Vergleich der nativen Lipoide von atypischen säurefesten Bacillen mit den Lipoiden von bekannten Mykobakterien. Am. Rev. Tubercul. Pulmonary Diseases 75: 843-45 (1957), Ref.: Chem. Zbl. 1958: 1048.

50) GUBAREW, J.M.: Die chemische Zusammensetzung der Diphtheriebakterien und die biologischen Eigenschaften der Oxydiphtheriesäure. Fortschr. gegenwärt. Biol. 31: 108-27 (1951), Ref.: 1951/II, 1: 543.

51) GUBAREW, J.M., GABRILOWITSCH, A.B. u. SCHTULBAUM, F.J.: Über die gebundenen Lipide der Diphtheriebazillen. Biochemie 17: 303-06 (1952), Ref.: Chem. Zbl. 1953: 3261.

63) GUBAREW, J.M., ALIMOWA, J.K. u. BOLGOWA, G.D.: Einige Daten zur chemischen Zusammensetzung der Brucellen. Biochemie 21: 647-54 (1956), Ref.: Chem. Zbl. 1957: 10 525.

74) GUBAREW, J.M., BOLGOWA, G.D. u. ALIMOWA, J.K.: Untersuchung der Fraktionen der freien und gebundenen Lipide von Brucella suis 44 nach der chromatographischen Methode. Biochemie 24: 200-04 (1959), Ref.: Chem. Zbl. 1959: 14 775.

75) GUBAREW, J.M. u. PUSSTOWALOWA, L.M.: Untersuchung der hochmolekularen Fettsäuren der Lipide der Diphtheriebakterien. Ukrain. biochem. J. 30: 569-84 (1958), Ref.: Chem. Zbl. 1959: 4 522.

83)	GUINAUD, M., MICHEL, G. u. LEDERER, E.:	Über die Lipoide von Nocardia asteroides. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 246: 843-51 (1958), Ref.: Chem. Zbl. 1960: 14 402.
120)	HARTMAN, L., MORICE, I. M. u. SHORLAND, F. B.:	Further Studies of the Lipids from Pithomyces chartarum and related Fungi. Biochem. J. 82: 76-80 (1962).
18)	HECHT, E.:	Zur Kenntnis der Phosphatide säurefester Bakterien. Biochem. Z. 279: 157-65 (1935), Ref.: Chem. Zbl. 1936/I: 2123.
90)	HENIS, Y., GOULD, J. R. u. ALEXANDER, M.:	Detection and Identification of Bacteria by Gaschromatography. Appl. Microbiol. 14: 513-24 (1966).
48)	HENNEMANN, H. H.:	Neuere Erkenntnisse von der Erforschung der Biochemie des Tuberkelbacillus (Übersicht über das Schrifttum). Z. ges. inneren Med. Grenzgebiete 5: 257-65 (1950), Ref.: Chem. Zbl. 1950/II: 1831.
58)	HOFMANN, K., HENIS, D. B., PANOS, Ch. u. CHAO-YING HSIAO:	Chemie und Tuberkulose. South African ind. Chemist. 9: 49-51 (1955), Ref.: Chem. Zbl. 1956: 1926.
57)	HOFMANN, K., HENIS, D. B., PANOS, Ch. u. CHAO-YING HSIAO:	Die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Bakterienlipide. J. Biol. Chem. 217: 49-60 (1955), Ref.: Chem. Zbl. 1956: 12597.
64)	HOFMANN, K. u. TAUSIG, F.:	Die chemische Natur der Fettsäuren von Streptokokkusarten der Gruppe C. J. Biol. Chem. 213: 415-23 (1955), Ref.: Chem. Zbl. 1957: 7 077.

65) HOFMANN, K. u. TAUSIG, F.: Einige Nachuntersuchungen des Fettsäurespektrums von Agrobacterium tumefaciens. J. Biol. Chem. 213: 425-32 (1955), Ref.: Chem. Zbl. 1957: 7 077.

52) HURST, H.: Elektronenbeugungsuntersuchungen der Lipidstruktur und -orientierung in Hefe- und Bakterienzellwänden. J. exp. Biol. 29: 30-53 (1952), Ref.: Chem. Zbl. 1953: 1351.

96) ISHIZUKA, I., UETA, N. u. YAMAKAWA, T.: Gaschromatographic studies of bacterial Components. II. Carbohydrate and Fatty Acid Constitution of the Family Micrococcaceae. Japan. J. Exp. Med. 36: 73-83 (1966).

45) JACINI, G.: Die Chemie der aktiven Stoffe des Tuberkulins. Saggiatore 3: 42-46 (1942), Ref.: Chem. Zbl. 1942/II: 2916.

89) JAMES, A. T. u. MARTIN, A. J. P.: Gas Liquid Partitition Chromatography: the Separation and Microestimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid. Biochem. J. 50: 679-90 (1952).

114) JAMES, A. T. u. MARTIN, A. J. P.: Gas-Liquid Chromatography: the Separation and Identification of Methyesters of Saturated and Unsaturated Acids from Formic Acid -n18-Acid. Biochem. J. 63: 144-52 (1956).

47) JARVIS, F. G. u. JOHNSON, M. J.: Ein von Pseudomonas aeruginosa erzeugtes Glykolipid. J. Am. che. Soc. 71: 4124-26 (1949), Ref.: Chem. Zbl. 1950/II: 544.

115) KANEDA, T.: Biosynthesis of branched Fatty Acids I. Isolation and Identification of Fatty Acids from Bac. subtilis. J. Biol. Chem: 238: 1222-28 (1963).

107) KANESHIRO, T. u. MARR, A. G.: Phospholipids of Azotobacter agilis, Agrobacterium tumefaciens and E. coli. J. Lipid Research 3:184-86 (1962).

110) KANESHIRO, T. u. MARR, A. G.: Cis-9, 10-Methylene Hexadecanoic Acid from Phospholipids of E. coli. J. Biol. Chem. 236: 2615-19 (1961).

55) KANTSCHUH, A. A.: Die Lipide des Chloroformextraktes der Diphtheriemikroben. Ukrain. Biochem. J. 26: 186-202 (1954), Ref.: Chem. Zbl. 1955: 6314.

66) KANTSCHUH, A. A.: Die Lipide des Chloroformextraktes der Diphtheriemikroben. Ukrain. biochem. J. 28:508-14 (1956), Ref.: Chem. Zbl. 1957: 7 076.

98) KATES, M.: Bacterial Lipids. Adv. Lip. Research 2:17-90 (1964).

78) KUBICA, G. P., RANDALL, H. M. u. SMITH, D. W.: Beziehungen zwischen biologischen Eigenschaften und ihren IR-Spektren. Ann. Rev. Tubercul. Pulmonary Diseases 73: 529-38 (1956), Ref.: 1959: 1387.

70) KWAPINSKI, J. u. MERKEL, M.: Die chemische und antigene Struktur des Streptomyces griseus. Bull. Acad. polon. Sci., Sér. Sci. biol. 5: 335-40 (1957), Ref.: Chem. Zbl. 1958: 13 815.

117) MACFARLAN, M. G.: Lipid Content of Staph. aureus and Salmonella Typhimurium. Biochem. J. 83: 40P-41P (1962).

14) MACHEBOEUF, A., SANDOV, G. u. NINI, C.: Physikochemische Studien über die Filtrate der säurebeständigen Bazillen der Tuberkulose. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 195: 275-76 (1934), Ref.: Chem. Zbl. 1935/I: 3943.

16) MACHEBOEUF, M., LEVY, G., FETHKE, N., DIERYCK, J. u. BONNEFOI, A.: Chemische Studien über den Tuberkelbacillus. Bull. Soc. chim. biol. 16:355-84(1934), Ref.: Chem. Zbl. 1935/I: 3943.

19) MACHEBOEUF, M. u. CASSAGUE, H.: Chemische Untersuchungen über den Diphtheriebacillus. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 200: 1988-90 (1935), Ref.: Chem. Zbl. 1936/I: 3158.

103) MARSHALL, J. H. u. KELSEY, J. C.: A standard Culture Medium for General Bacteriology. J. Hyg. 58: 367-72 (1960).

94) MASTROENI, P. u. CONTADINI, V.: The Relationship between Lipid and taxonomic classification of Microorganisms. Differences between gramnegative and grampositive bacteria. Giom. Microbiol. 14: 99-105 (1966).

126) MERDINGER, E. u. DEVINE jr., E. M.: Lipids of Debaromyces hansenii. J. Bacteriol. 89: 1488-93 (1965).

127) MERDINGER, E.: Lipids of Pullularia pullulans. Can. J. Microbiol. 12: 206-208 (1966).

71) MERKEL, M.: Die chemische und antigene Struktur des Trichophyton gypseum. Bull. Acad. polon. Sci., Sér. Sci. biol. 5: 341-45 (1957), Ref.: Chem. Zbl. 1958: 13 815.

105) METCALFE, L.D., SCHMITZ, A.A. u. PELKA, J.R.: Rapid Preparation of Fatty Acid Esters from Lipids for Gas Chromatographic Analysis. Anal. Chem. 38: 514-15 (1966).

80) MORGAN, E.D. u. POLGAR, N.: Bestandteile der Lipide von Tuberkelbazillen. Untersuchungen über Mycolsäure. J. chem. Soc. 3779-86 (1957), Ref.: Chem. Zbl. 1959: 12 516.

132) MOSS, C.W. u. CHERRY, W.B.: Characterization of the C_{15}-Branched Chain Fatty Acids of Corynebacterium acnes by Gaschromatography. J. Bacteriol. 95: 241-42 (1968).

109) O'LEARY, W.M.: Involvement of Methionine in Bacterial Lipid Synthesis. J. Bact. 78: 709-13 (1959).

121) O'LEARY, W.M.: Decenoic, Duodecenoic and Tetradecenoic Acids in the Lactobacteriaceae. Biochem. J. 4: 1621-27 (1965).

134) O'LEARY, W.M.: The Chemistry and Metabolism of Microbial Lipids. Cleveland, Ohio, The Word Publishing Company, 1967.

118) PANOS, C., COHN, M. u. FAGAN, G.: Lipids Alteration after Cell Wall Inhibition. Fatty Acids Content of Streptococcus pyogenes and derived L-Form. Biochem. J. 5: 1461-68 (1966).

62) PORTELANCE, V. u. PANISSETT, M.: Untersuchungen an Mycobakterien. Die Lipide von Mycobakterium tuberkulosis var. BCG. Rev. canad. Biol. 16: 112-38 (1957), Ref.: Chem. Zbl. 1957: 13 386.

99) PORTER, J. R.: Bacterial Chemistry and Physiology. John Wiley & Sons Inc. New York, 1946.

91) REINER, E.: Identification of Bacterial Strains by Pyrolysis Gas-Liquid Chromatography. Nature 206: 1272-74 (1965).

113) ROMERO, E. M. u. BRENNER, R. R.: Fatty Acids Synthesized from Hexadecane by Ps. aeruginosa. J. Bact. 91: 183-88 (1966).

82) SAITO, K. u. AKASHI, S.: Lipidmaterial von Bac. alkaligenes faecalis. Untersuchungen der acetonunlöslichen Fraktion durch Papierelektrophorese. J. Biochemistry 44:511-24 (1957), Ref.: Chem. Zbl. 1960: 7556.

38) SCHÄFER, W.: Über die Antigenstruktur der Tuberkelbacillen des Menschen und des Rindes. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 209: 129-31 (1939), Ref.: Chem. Zbl. 1939/II: 4499.

136) SEELIGER, H. R. P.: Taxonomie als Ordnungsprinzip in der Mikrobiologie. Zbl. Bakt. 205: 178-84 (1967).

79) SOIMU, J. u. IONESCU, C.: Der Lipidgehalt des gegenüber Streptomycin sensiblen und resistenten Mykobakterium avium. Studii Cercetari Inframicrobiol., Microbiol., Parazitol. 6: 277-83 (1955), Ref.: Chem. Zbl. 1959: 1170.

21) SPIELMANN, M. A. u. ANDERSON, R. J.: Die Chemie der Lipoide von Tuberkelbacillen. Untersuchungen über Phthionsäure. J. Biol. Chem. 112: 759-67 (1936), Ref.: Chem. Zbl. 1938/I: 2199.

76)	SUZANNE, M., PORTELANCE, V. u. PANISSET, M.:	Untersuchungen und chemische Analyse der Lipide von Mykobakterien. Canad. J. Microbiol. 2 :685-701(1956), Ref.: Chem. Zbl. 1959: 16 684.
112)	THORNE, K.J.I. u. KODICEK, E.:	The Metabolism of Acetat and Mevalonic Acid by Lactobacilli. Biochim. Biophys. Acta 59: 306-12 (1962).
131)	TORNABENE, T.G., BENNETT, E.O. u. ORÒ, J.:	Identification of Fatty Acids and Aliphati Hydrocarbons in Sarcina lutea by Gas Chromatography and Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry. J. Bacteriol. 94: 333-43 (1967).
130)	TORNABENE, T.G., BENNETT, E.O. u. ORÒ, J.:	Fatty Acid and Hydrocarbon Composition of Sarcina lutea grown in Three Different Media. J. Bacteriol. 94: 344-48 (1967).
133)	TORNABENE, T.G. u. ORÒ, J.:	^{14}C Incorporation into Fatty Acids and Aliphatic Hydrocarbons of Sarcina lutea. J. Bacteriol. 94: 349-58 (1967).
41)	TSCHERNOCH-WOSTOW, W.A., BEILIUSSON, A.W., LETAWET, K.S. u. BOBKOWA, M.P.:	Über die Immunisierenden Eigenschaften der Lipoidpolysaccharidfraktion der Paratyphus-Breslaustäbchen. J. Microbiol. Epidemiol. Immunbiol. Moskau, 1940 Nr. 5 13-22, Ref.: Chem. Zbl. 1940/II: 1596.
43)	TSCHERNOCHWOSS-TOW, W.A.:	Über immunisierende Eigenschaften der Lipoid-Polysaccharidfraktion des Bacillus typhi abdominalis. J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunbiol. 1940: Nr. 12 3-8 Moskau, Ref.: Chem. Zbl. 1942/I: 762.

17)	ULZER, F. u. GRUBER, H.:	Untersuchungen über das "Säurewachs" der menschlichen Tuberkelbacillen. Wiss. Mitt. Österr. Heilmittelstelle, Folge 13 1.-3. Mai 1935, Ref.: Chem. Zbl. 1935/II: 1196.
59)	USCHIU, V.R. u. BURREL, R.C.:	Vorläufige Untersuchungen der Lipide von Thodotorula gracilis. Arch. Biochem. Biophysics 36: 172-77 (1952), Ref.: Chem. Zbl. 1956: 1926.
95)	VACZI, L., RÉTHY, A. u. REDAI, J.:	Fatty Acids in Enteric Bacteria. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 11: 375-81 (1965).
122)	WALKER, R.W. u. FAGERSON, I.S.:	Studies of the Lipids of Arthrobacter globiformis G16. I. Fatty acid composition. Can. J. Microbiol. 11: 229-33 (1965).
4)	WEISS, G.:	Zur Kenntnis des Hefefetts. Biochem. Zschr. 243: 269-73 (1931), Ref.: Chem. Zbl. 1931/I: 961.
124)	WILCOXON-Test:	s. Documenta Geigy S. 93.
92)	YAMAKAWA, T. u. UETA, N.:	Gaschromatographic studies of microbial components. I. Carbohydrate and Fatty Acid Constitution of Neisseria. Japan. J. Exp. Med. 34: 361-71 (1964)

Literaturverzeichnis für die Tabellen 3-11 (S. 61)

93	siehe	unter	ABEL
95	"	"	VACZI
96	"	"	ISHIZUKA
98	"	"	KATES
102	"	"	ASSELINEAU (102)
106	"	"	CHO
107	"	"	KANESHIRO (107)
108	"	"	ASSELINEAU (108)
109	"	"	O'LEARY (109)
111	"	"	DAUNDRY (111)
112	"	"	THORNE
113	"	"	ROMERO
114	"	"	JAMES (114)
115	"	"	KANEDA
117	"	"	MACFARLANE
118	"	"	PANOS
119	"	"	BORDET
120	"	"	HARTMANN
121	"	"	O'LEARY (121)
132	"	"	MOSS

7. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Dr. ZIMMERMANN für die Überlassung des Themas, die Einrichtung eines Arbeitsplatzes und die gegebene Hilfe.

Ebenso danke ich Herrn Diplomchemiker RÜBELT und Herrn Dr. rer. nat. SCHWEISFURTH für ihre bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teiles.

8. Lebenslauf

Am 20. Juni 1941 wurde ich als Sohn des Amtsarztes Dr. Roman Blaschy in Dresden geboren.

Nach der Vertreibung aus Schlesien durch die sowjetische Besatzungsmacht kamen wir nach Peine, wo ich die Volksschule und anschließend das neusprachlich-naturwissenschaftliche Gymnasium bis zur Mitte der Obersekunda besuchte. In Seesen/Harz beendete ich den Besuch der höheren Schule mit dem Abitur im März 1961 an dem dortigen neusprachlich-naturwissenschaftlichen Gymnasium.

Von April 1961 bis zum März 1963 war ich Angehöriger der Bundeswehr.

Das anschließende Studium der Medizin begann ich im Mai 1963 an der Universität des Saarlandes. Nach sechs vorklinischen Semestern legte ich dort das Physikum im April 1966 und nach weiteren sechs klinischen Semestern das Staatsexamen im Juli 1969 ab.